

**Vollblutaggregometrie bei 598 kardiovaskulären Patienten:  
Modulation der Plättchenaggregation unter Therapie mit  
AT1-Rezeptorantagonisten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität  
Bonn**

**vorgelegt von:   Achim Viktor  
aus:               Bitburg**

**Erscheinungsjahr: 2007**

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. G. Bauriedel
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. U. Klehr

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.10.2007

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Nickenig

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Historische Einführung in die Physiologie und Pathologie der Thrombozytenaggregation .....	7
1.2 Grundlagen der Hämostase unter besonderer Betrachtung der Thrombozytenaggregation .....	9
1.2.1 Physiologie der Blutgerinnung und der Fibrinolyse .....	9
1.2.2 Aufbau der Thrombozyten .....	10
1.2.3 Funktionsstadien der Thrombozytenaktivierung mit sekundärer Hämostase .....	11
1.2.4 Plättchenmembranrezeptoren .....	13
1.3 Thrombozytenfunktionstestung mittels aggregometrischer Verfahren .....	14
1.4 Thrombozyten und ihre Rolle an der Pathophysiologie der KHK .....	17
1.4.1 Störung der Endothelzellfunktion – endotheliale Dysfunktion .....	17
1.4.2 Einfluss der Thrombozyten auf die Atherogenese und Progression der Atherosklerose .....	19
1.4.3 Die Rolle der Thrombozyten beim akuten Koronarsyndrom (ACS).....	21
1.4.4 Therapie der Atherosklerose .....	24
1.5 Das Renin-Angiotensin-System.....	28
1.5.1 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) .....	28
1.5.2 Angiotensin-II-Rezeptoren .....	30
1.5.3 Aktuelle Vorarbeiten.....	32
<b>2 Zielsetzung und Fragestellung .....</b>	<b>33</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1 Patienten.....	35
3.2 Testung der Thrombozytenfunktion mit der Vollblut-Lumi-Aggregometrie .....	35
3.2.1 Material .....	35
3.2.2 Reagenzien .....	36
3.2.3 Blutentnahmen.....	37
3.2.4 Blutprobenpräparation .....	37
3.2.5 Ablauf einer Messung .....	38
3.2.6 Auswertung der Kurven .....	40
3.2.7 Störfaktoren/Fehlerquellen .....	43
3.3 In vitro-Messreihe .....	44
3.3.1 In vitro-Valsartan-Messreihe.....	44
3.4 Statistische Analyse.....	45
3.4.1 Auswertung der Daten .....	45
3.4.2 Graphische Darstellung der Ergebnisse .....	45
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1 Erhebung eines Normalkollektives/Vergleichskollektives.....	47
4.1.1 Untersuchung der Plättchenaggregation in Abhängigkeit von speziellen Laborparametern, Alter .....	47
4.1.2 Untersuchung der Plättchenaggregation in Abhängigkeit von der Medikation .....	51
4.1.3 Vergleich der Plättchenaggregation in Vene und Arterie.....	61
4.2 Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation.....	62
4.3 Testung der Plättchenaggregation bei Therapie mit etablierten antithrombozytären Substanzen .....	67
4.4 Testung der Plättchenaggregation bei Patienten mit ACE-Hemmer Therapie.....	72

4.5	Testung der Plättchenaggregation bei Patienten mit AT1-Rezeptorantagonisten Therapie .....	77
4.6	Differenzierte Betrachtung der Plättchenaggregation der beiden Wirkstoffe Losartan und Valsartan .....	83
4.7	Messung der Plättchenaggregation im Verlauf von vier Wochen bei Patienten unter Neueinstellung mit Valsartan .....	85
4.8	In vitro-Messreihe zur Testung der möglichen Modulation der Plättchenaggregation durch die Rohsubstanz .....	
	Valsartan.....	87
4.9	Testung der Plättchenaggregation von Diabetikern mit ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonist Therapie.....	89
4.9.1	Diabetiker mit ACE-Hemmer Therapie .....	89
4.9.2	Diabetiker mit AT1-Rezeptorantagonist Therapie.....	92
4.10	Testung der Plättchenaggregation bei Patienten mit Nikotin-konsum und Therapie mit einem ACE-Hemmer.....	94
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
5.1	Einfluss ausgewählter Laborparameter, Geschlecht und Alter auf die Plättchenaggregation.....	96
5.2	Einfluss der medikamentösen Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen auf die Plättchenaggregation .....	97
5.3	Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation.....	97
5.3.1	Modulation der Plättchenaggregation durch den Risikofaktor Diabetes mellitus.....	99
5.3.2	Modulation der Plättchenaggregation durch den Risikofaktor Depression.....	105
5.3.3	Modulation der Plättchenaggregation durch den Risikofaktor Nikotinkonsum.....	106
5.4	Einfluss der medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-System (RAS) auf die Plättchenaggregation.....	108
5.4.1	Modulation der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer .....	108
5.4.2	Modulation der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem AT1-Blocker.....	109
5.4.3	Gemeinsame Diskussion der Modulation der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer und einem AT1-Blocker.....	109
5.4.4	Unterschiede zwischen der Therapie mit einem ACE-Hemmer und einem AT1-Blocker.....	118
5.4.5	Beeinflussung der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer und AT1-Blocker bei Diabetikern .....	119
5.4.6	Beeinflussung der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer bei Patienten mit Nikotinkonsum .....	120
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>146</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>147</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	Advanced glycation end products
Ang II	Angiotensin II
AP	Angina pectoris
AP-1	Aktivator Protein-1
ARB	Angiotensin 1-Rezeptorblocker
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosindiphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CAGE	Chymostatin-sensitive Ang II-generating enzyme
CD	Cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CK	Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
CTGF	Connective tissue growth factor
COX	Cyclooxygenase
DM	Diabetes mellitus
EDHF	Endothelium-dependent hyperpolarisation factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ET-1	Endothelin-1
GP	Glykoprotein
HbA1C	Glykiertes Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HMWK	High molecular weight kininogen
IAP	Instabile Angina pectoris
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
ICD	International Classification of Diseases
IGF-1	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
KHK	Koronare Herzkrankheit
KOH	Kalium-Hydroxid
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon (Lutropin)
LH-RH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage-colony-stimulating factor
mg	Milligramm
MMP	Matrixmetalloproteinasen

MPV	median platelet volume
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	Nuclear-factor-kappaB
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungs-Infarkt
PAF	Platelet-activating factor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PKC	Protein Kinase C
Q	Quartil
RAS	Renin-Angiotensin-Sysytem
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PDTC	Pyrolidine dithiocarbamate
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRP	Plättchenreiches Plasma
SCS	Surface connecting system
STEMI	ST-Streckenhebungs-Infarkt
TBARS	Thiobarbitursäurereaktiven Substanzen
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
t-PA	tissue-Plasminogen-Aktivator
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
vWF	von Willebrand Faktor
WB	Whole blood

# 1 Einleitung

## 1.1 Historische Einführung in die Physiologie und Pathologie der Thrombozytenaggregation

Die ersten Abhandlungen über die Blutplättchen wurden bereits Anfang des 19. Jahrhunderts geschrieben. So war es 1836 Hermann Nasse (1807-1892), der in seinem Werk „Das Blut in mehrfacher Beziehung physiologisch und pathologisch untersucht“ die Blutplättchen als „seltsame kleine Kügelchen oder Körner, die sich zu unregelmäßigen Haufen verbinden und verbacken“ beschrieb. Andere Forscher wie Alfred Donne (1801-1866) beschrieb die Thrombozyten als Chyluskörperchen und Gustav Zimmermann (1817-1866) betrachtete sie als aus der Lymphe kommende Erythrozytenvorstufen. Giulio Bizzozero war der Erste, der die eigenständige Existenz der Plättchen und den Zusammenhang zur Blutgerinnung beschrieb. Er formulierte seine Entdeckungen in seinem Werk „Über einen neuen Formenbestand des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung“. Einige Jahre später entdeckte James H. Wright (1869-1928), dass Thrombozyten Abschnürungen der Plasmamembran der Megakaryozyten im Knochenmark sind. In den folgenden Jahren hat die Erkenntnis über die Blutplättchen in Bezug auf ihre physiologische wie auch pathophysiologische Bedeutung weiter zugenommen. Physiologischerweise sind die Blutplättchen oder Thrombozyten an der Blutstillung oder Hämostase beteiligt. Ihre Aufgabe ist es, durch Anhaften (=Adhäsion) an Gefäßläsionen und nachfolgende Aggregation, d.h. Bildung von Plättchenkonglomeraten, das Gefäßlumen zur Umgebung hin abzudichten und die aus der Verletzung resultierende Blutung zum Stillstand zu bringen. Daneben steht die pathophysiologische Bedeutung der Blutplättchen im Zusammenhang mit Fehlfunktionen des hämostatischen Systems in den letzten Jahrzehnten im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Noch vor der Entdeckung der Thrombozyten legte Virchow die Grundlagen für die Thromboseforschung. Für ihn, der Thrombenbildung noch mit Blutgerinnung gleichsetzte, war es die Trias aus den Kompartementen Blut, Strömung und Gefäßwand, die sowohl per se als auch in Interaktion ursächlich an Blutstillung und Thromboseentstehung teilnahmen (Virchow, 1865). In Anlehnung an Virchows

Hypothese, dass eine erhöhte Gerinnungsbereitschaft des Blutes verantwortlich für die Pfropfbildung sei, führten Eberth und Schimmelbusch 1885 den Begriff der „viscösen Metamorphose“ der Thrombozyten ein. Sie meinten damit eine „klebrige Veränderung“ der Plättchen, die notwendig für „die Verschmelzung eines im Blut vorhandenen Zellgebildes“ ist. Sie machten damit zum ersten Mal konkrete Aussagen über eine aktive Teilnahme der Blutplättchen am thrombotischen Geschehen. Weiter untermauerten sie experimentell die These, dass die Blutplättchen sowohl bei Hämostase, als auch bei der Thrombose in einen Aktivierungsprozess eingebunden sind. Diese Anschauung bestimmt auch noch heutige Forschungsansätze. 1888 unterschieden Eberth und Schimmelbusch darüber hinaus als erste die Vorgänge Adhäsion und Aggregation. Diese Untersuchungen bilden heute die Grundlage für den bekannten Mechanismus der Entstehung des primären Plättchenthrombus: Thrombozyten haften (adhärieren) zunächst über Zytoplasmafortsätze (Pseudopodien) an durch Gefäßwandverletzung freigelegten subendothelialen Strukturen (z. B. Kollagen) und breiten sich dann großflächig darauf aus („spreading“). Das Anhaften zusätzlicher Plättchen an den bereits haftenden wird dann als Aggregation bezeichnet und führt zur Ausbildung des Plättchenthrombus (Sixma et al., 1995). Zudem erkannten Eberth und Schimmelbusch schon damals die Bedeutung des plasmatischen Gerinnungssystems und vor allem die Unterscheidung dessen von der Plättchen-vermittelten Hämostase. Weiter interpretierten sie die strömungs-mechanische Hypothese Virchows nicht einfach als Stase mit nachfolgendem Gerinnungsprozess, sondern sahen, dass bestimmte Strömungskonstellationen für die Entstehung von Blutplättchenthromben erforderlich sind, so zum Beispiel an Gefäßregionen mit Krümmungen, Verzweigungen und Stenosen, die zur Wirbelbildung der Strömung führen.

Der dritte Bestandteil der Trias Virchows, die Gefäßwand, ist bei der Thromboseentstehung mit dem Zweiten, der Strömung, engstens verknüpft: Stenosen mit nachfolgender Wirbelbildung entstehen bevorzugt an Stellen, an denen das regelmäßige rohrförmige Lumen durch degenerative Veränderungen der Gefäßwand unterbrochen ist und damit eine Störung der laminaren Strömung eintritt. Von großer Wichtigkeit ist in diesem Zusammenhang auch die Umwandlung der Gefäßwand selbst. Diese hat große Bedeutung für die Wechselwirkungen zwischen Blutplättchen und atherosklerotisch alterierter Gefäßwand. Die enge Verknüpfung der Atherosklerose mit



der Thrombose ist heute unbestritten. Schon Rokitanski brachte 1842 die Entstehung atherosklerotischer Plaques mit der Ablagerung von Blutbestandteilen in Verbindung. Virchow dagegen vertrat im Widerspruch zu dieser Ablagerungshypothese die Ansicht, dass die Plaques nicht vom Lumen her auf der Gefäßintima entstünden, sondern als Folge degenerativer Prozesse in der Gefäßwand selbst.

Der Grundstein für die heutige Ansicht zur Atheroskleroseentstehung wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von Marchand gelegt, der die Entstehung atherosklerotischer Plaques als Insudation von Lipiden in die Gefäßintima und nachfolgende fibröse Proliferation ansah. Die Bildung von Thromben auf dem Boden dieser strukturellen und chemischen Veränderungen der Gefäßwand wurde dabei als sekundärer Prozess aufgefasst. Weiter wird die Atherosklerose heute als eine chronische Entzündungsantwort der Arterienwand auf eine Schädigung des Endothels angesehen (Ross, 1993). Zu dieser Entzündungsantwort gehört neben der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und der Expression von Adhäsionsmolekülen auch die Bildung freier Sauerstoffradikale in der Gefäßwand, das auch als oxidativer Stress bezeichnet wird.

## **1.2 Grundlagen der Hämostase unter besonderer Betrachtung der Thrombozytenaggregation**

### **1.2.1 Physiologie der Blutgerinnung und der Fibrinolyse**

Das hämostatische System, bestehend aus Thrombozyten, Plasmafaktoren und der Gefäßwand, schützt den Organismus bei Gewebsverletzungen durch Interaktion gegen den Verlust von Blut. Die Blutungsstillung (Hämostase) lässt sich anhand des Zeitablaufs in verschiedene Stadien aufgliedern: primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse. In der *primären Hämostase* adhären Thrombozyten an Strukturen der Gefäßwandläsion (Adhäsion) und bilden durch Interaktion mit weiteren Blutplättchen (Aggregation) den primären Thrombus, der noch fragil ist und sich leicht von der Gefäßwand ablösen kann. Die *sekundäre Hämostase* ist durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade gekennzeichnet. Hier kommt es durch proteolytische Spaltung von Prothrombin zur Bildung von Thrombin, welches wiederum durch Spaltung von Fibrinogen zur Bildung von Fibrin führt. Fibrin verfestigt das fragile Plättchenaggregat und dichtet so die Gefäßwandverletzung gegenüber dem Blutstrom stabil ab und leitet

den Heilungsprozess ein. Durch *Fibrinolyse* kommt es während der Heilungsphase zum schrittweisen Abbau des hämostatischen Thrombus.

### 1.2.2 Aufbau der Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes (Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$ ). Sie besitzen eine diskoide Form, sind kernlos (anukleär) und zirkulieren mit einer durchschnittlichen Anzahl von 150.000 bis 300.000/ $\mu\text{l}$  für neun bis zehn Tage im peripheren Blut. Ihre tägliche Erneuerungsrate beträgt etwa 20%. Die Thrombozyten zeigen einen komplexen inneren Aufbau, den man nach Mackie (Mackie et al., 1988) aufgrund morphologischer Kriterien in vier unterschiedliche Zonen einteilen kann:

a) *Periphere Zone*: Besteht aus der Zytoplasmamembran, die als typische polarisierte Phospholipidschicht (Bilayer) aufgebaut ist und in die Glykoproteine, Proteine und Mukopolysacharide (Glykokalix) eingebettet sind. Die Glykoproteine übernehmen als Oberflächenrezeptoren spezifische Funktionen.

b) *Strukturelle Zone*: Enthält das Zytoplasma und das Zytoskelett, das sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und submembranös gelagerten Aktinfilamenten zusammensetzt. Die Verankerung dieses fibrillären, kontraktile Systems mit der Zellmembran ermöglicht dem stimulierten Thrombozyten aktive Formveränderung und die Ausbildung von Pseudopodien.

c) *Zone der Zellorganellen*: In diesem Bereich befinden sich vor allem Mitochondrien, Golgi-Apparate, Ribosomen und eine höhere Anzahl an Granula. Bei den Granula werden Lysosomen,  $\alpha$ -Granula und dichte Granula („dense bodies“) unterschieden. Namensgebend für die dichten Granula ist ihre elektronenoptische Dichte. Sie enthalten niedermolekulare Verbindungen (ADP, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , Serotonin), die den Aggregationsvorgang fördern. Die Alpha-Granula enthalten eine Reihe von Proteinen, die die Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation und Koagulation beeinflussen. Die Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme.

d) *Membransysteme*: Es besteht zum einen aus dem offenen kanalikulären System („surface connected open canalicular system“), zum anderen aus dem dichten tubulären System („dense tubular system“). Das offene kanalikuläre System verbindet das Innere der Thrombozyten über Kanäle mit der Plasmamembran. Das dichte tubuläre System ist ein Abkömmling des rauen endoplasmatischen Retikulums und ist einer der

Hauptspeicherorte für freie Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), die eine zentrale Rolle in der Regulation des Plättchenmetabolismus und der -aktivierung einnehmen. Das Überschreiten einer Schwelle der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt zu einer Formveränderung des Blutplättchens mit Bildung von Pseudopodien und Freisetzung der Granulainhaltsstoffe (Sekretion).

### **1.2.3 Funktionsstadien der Thrombozytenaktivierung mit sekundärer Hämostase**

Wie bereits unter 1.2.1 angeführt, lassen sich bei der Thrombozytenaktivierung zwei Funktionsstadien unterscheiden: die Adhäsion und die Aggregation. Die Adhäsion noch ruhender Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird primäre Adhäsion genannt. Die primäre Adhäsion führt zur Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der Thrombozyten mit nachfolgender Freisetzung der gespeicherten Sekrete aus Granula und der Bildung von Thrombozytenaggregaten. Die Anlagerung von aktivierten Thrombozyten an die Strukturen des Subendothels wird als sekundäre Adhäsion bezeichnet (Andrews et al., 1997; DeGroot et al., 1990; Ruggeri et al., 1994). Gesteuert wird der Adhäsionsvorgang durch thrombozytäre Membranglykoproteine. Dabei besitzen Thrombozyten eine Reihe von membranständigen Adhäsionsrezeptoren, die spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix im Bereich der Media und des Subendothels erkennen. Durch den ersten Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Oberfläche des Subendothels im Bereich einer Verletzung der Gefäßwand bindet der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex an Kollagen-immobilisiertem „Von-Willebrand-Faktor“. Es kommt zur Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand, zur sogenannten Kontaktphase (Nurden et al., 1994). Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren, wie den Kollagen-, Fibronektin- oder Lamininrezeptor (Rezeptorfamilie der Integrine), erfolgt eine Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion. Vor allem die Bindung des Kollagenrezeptors (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) an Kollagen führt zu Aktivierung des adhärenen Thrombozyten und dessen Formveränderung („shape change“) mit der Bildung von Pseudopodien, die sich über die gesamte verletzte Stelle ausbreiten und so die Abdichtung des Defektes gewährleisten. Die Thrombozyten sezernieren Stoffe, die die Adhäsion weiterer Thrombozyten fördern (vWF), solche, die vasokonstriktorisch wirken (Serotonin, PDGF= platelet-derived growth

factor, Thromboxan  $A_2 = TxA_2$ ) und somit den Blutstrom verlangsamen, sowie Mediatoren, mit denen die Thrombozyten-Aktivierung verstärkt und weitere Thrombozyten rekrutiert und aktiviert werden (ADP,  $TxA_2$ , PAF= platelet-activating factor). Die Granulainhaltsstoffe verstärken autokrin den Aktivierungsvorgang, parakrin induzieren sie durch Stimulation noch ruhender und zirkulierender Thrombozyten die Aggregation mit schon adhärennten Thrombozyten (Siess et al., 1989). Die Interaktion von noch zirkulierenden Thrombozyten mit bereits adhärennten Thrombozyten wird durch die ADP-, Thrombin- und Adrenalin-induzierte Konformationsänderung der GPIIb-IIIa-Rezeptoren (Fibrinogenrezeptoren) ermöglicht (Nurden et al., 1994). Diese Konformationsänderung erlaubt durch Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen („Fibrinogentaschen“) die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa-Rezeptor und damit an die Membran der Thrombozyten (Gawaz et al., 1999). Im weiteren Verlauf bewirken Fibrinogenbrücken (reversibler Vorgang) die Ausbildung von Thrombozytenaggregaten (Gawaz et al., 1991; Ginsberg et al., 1995; Plow et al., 1992; Siess et al., 1989). Für eine normal verlaufende Aggregation sind drei Bedingungen entscheidend: Scherkraft (Erhöhung der Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen zwei Thrombozyten),  $Ca^{2+}$  und Fibrinogen. Wenn eine der drei Komponenten fehlt, können die Thrombozyten nicht aggregieren.

Die noch relativ instabilen Plättchenaggregate werden in der *sekundären Hämostase* nach Aktivierung der Gerinnungskaskade durch die Quervernetzung mit Fibrin und der anschließenden Retraktion des Plättchen-Fibrin-Konglomerats (Gerinnselretraktion) gefestigt. Die meisten Gerinnungsfaktoren sind normalerweise nicht aktiv (zymogen) und werden durch eine Kaskade aktiviert. Diese hat Verstärkungswirkung, so dass auch kleinste Mengen des auslösenden Faktors für eine rasche Gerinnung sorgen. Zu unterscheiden ist, dass die Gerinnung intrinsisch (im Gefäß) oder extrinsisch (von außen) gestartet werden kann.

Das *intrinsische System* besteht aus Komponenten, die sich alle im Blutplasma befinden und beinhaltet die Gerinnungsfaktoren XII, XI, IX, VIII, „high molecular weight kininogen“ (HMWK) und Präkallikrein. Dieses System wird durch Bindung von vier Kontaktfaktoren (Faktor XII, XI, Präkallikrein, HMWK) an negativen Ladungen der subendothelialen Matrix und der aktivierten Thrombozytenoberfläche aktiviert. Diese Kontaktaktivierung führt zur Aktivierung des Faktor X, dem ersten Faktor der gemeinsamen Endstrecke.

Dieser Faktor wird auch über den *extrinsischen Weg* aktiviert, der den Faktor VII und einen Kofaktor, das Gewebethromboplastin (tissue factor) beinhaltet. Der tissue factor ist ein integrales Membranprotein, das vorwiegend auf Gefäßwandzellen und auch auf zirkulierenden Monozyten zu finden ist. Die Aktivierung über den extrinsischen Weg erfolgt im Vergleich zum intrinsischen schnell und spielt eine bedeutende Rolle bei akuten thrombotischen Mechanismen im Bereich atherosklerotischer Gefäße.

Die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade kann in drei Abschnitte unterteilt werden: Aktivierung des Faktors X, Bildung von Thrombin aus Prothrombin und Fibrinogenspaltung zu Fibrin. Inhibitoren wie Antithrombin III, Protein C und S, „tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI) steuern einer übermäßigen Gerinnung entgegen. Nach Bildung von Fibrin ist der letzte Schritt der Gerinnungskaskade das Zusammenziehen des Blutkuchens („clot retraction“).

#### **1.2.4 Plättchenmembranrezeptoren**

Die Mechanismen der Hämostase erfordern ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der Gefäßwand. Adhäsionsvorgänge spielen dabei eine wesentliche Rolle. Hierzu weisen Blutplättchen membranständige Glykoproteine auf, welche die Interaktion von Thrombozyten untereinander und mit Endothelzellen (GPIIb-IIIa), mit der subendothelialen Matrix (vWF-Rezeptor, Kollagenrezeptor), mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren oder mit Leukozyten (P-Selektin) vermitteln. Anhand der charakteristischen Molekülstruktur teilt man die Rezeptoren in vier Klassen ein: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren von Immunglobulintyp. Die Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten (eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette) und sind transmembranös in der Zellwand verankert und verbinden so Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix. Sie interagieren mit Glykoproteinen, wie Kollagen, Fibrinogen und dem von-Willebrand-Faktor. Das GPIIb/IIIa - mittlerweile häufiger als Integrin  $\alpha$ IIb- $\beta$ 3 bezeichnet – ist der häufigste auf der Plättchenmembran vorkommende Rezeptor (Charo et al., 1994). Im Ruhezustand sind 70-80% des GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, die restlichen 20-30% befinden sich in den intrazellulären  $\alpha$ -Granula (siehe 1.2.2) und im offenen kanalikulären System („surface connecting system“ (SCS)) (Morgenstern et al., 1997; Nurden et al., 1994).

Durch Aktivierung der Thrombozyten gelangt dieser innere Speicher an die Zelloberfläche (Woods et al., 1986). Der GP-Ib-V-IX-Komplex zählt zu den leuzinreichen Glykoproteinen und ist ein Adhäsionsrezeptor für den von-Willebrand-Faktor und spielt eine zentrale Rolle in der primären Hämostase. P-Selektin ist ein weiteres Membranglykoprotein, das in den  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen und in den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen lokalisiert ist. Durch Aktivierung der Plättchen kommt es zu einer Verschmelzung der  $\alpha$ -Granula mit dem SCS und zur Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. P-Selektin ist ein wichtiger Oberflächenrezeptor für die Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Die Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulintyp scheinen eine Rolle bei der Thrombozytenadhäsion an Leukozyten und an das Subendothel zu spielen.

### **1.3 Thrombozytenfunktionstestung mittels aggregometrischer Verfahren**

Die heute gebräuchlichsten Methoden für die Thrombozytenfunktionstestung sind die Bestimmung der Plättchenaggregation mittels photometrischer Aggregometrie nach Born (Born 1964) in plättchenreichem Plasma (PRP) oder mit der Impedanz-Aggregometrie in PRP oder Vollblut (whole blood, WB).

Die Methode nach Born beruht auf der Eigenschaft, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig von der Partikelzahl und nicht von deren Größe ist. PRP wird durch niedrigtourige Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) gewonnen (z.B. 10 min bei 800-1000 Umdrehungen pro Minute). Das gewonnene PRP wird hierbei in silikonisierte Glasküvetten gegeben und unter Verwendung eines Rührstäbchens (konstant 1000 Umdrehungen pro Minute) mittels Magnetrührer durchmischt. Durch ein photometrisches Verfahren wird die plättchenbedingte Trübung der Suspension anhand einer Referenzküvette, die 500  $\mu$ l PRP enthält und den 100%-Wert der Lichttransmission darstellt, bestimmt. Durch Zugabe eines Plättchenstimulus in die mit PRP gefüllte Küvette kommt es zur Aggregatbildung und damit zur Abnahme der Trübung und zur Zunahme der Lichttransmission. Der Grad der Trübungsänderung ist ein Maß für die Aggregation, welche als Funktion der Zeit mittels Schreiber in Form einer Aggregationskurve aufgezeichnet wird. Bei Zusatz von ADP als Plättchenstimulus stellt

sich zunächst die Formveränderung der Thrombozyten („shape change“) ein, was an der Aggregationskurve anhand der Abnahme der Lichttransmission erkannt werden kann. Danach steigt die Aggregationskurve durch Zunahme der Lichttransmission an (primäre, noch reversible Aggregation), die entweder im weiteren Verlauf wieder rückgängig ist (Deaggregation) oder nach vorübergehendem Erreichen eines Plateaus (biphasische Aggregation) in eine zweite Aggregationsphase übergeht (sekundäre, irreversible Aggregation).

Die Methode der photometrischen Aggregometrie weist einige Nachteile auf. Die Zentrifugation, die notwendig ist um PRP herzustellen, ist zeitlich sehr aufwendig. Die Aggregation kann nicht unter physiologischen Bedingungen in Anwesenheit von anderen Blutzellen ablaufen. Die Calciumkonzentrationen sind sehr viel niedriger und der pH-Wert ist deutlich höher. Empfindliche Modulatoren der Plättchenaggregation, wie zum Beispiel Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub>, können während der Präparation von PRP zerstört werden. Bei Makrothrombozytopenien ist oft eine Spontansedimentation notwendig. Problematisch ist hierbei, dass es dabei fast immer zu einer Beimischung anderer Zellen kommt, die das Aggregationsmuster beeinflussen. Grundsätzlich kann niemals eine repräsentative Population an Thrombozyten gewonnen werden, da die größten - oft reaktivsten - Thrombozyten mit dem Leuko- oder Erythrozyten sedimentieren. Dies führt zu Problemen bei der Probenverarbeitung von Patienten mit Makrothrombozytopenien oder Patienten mit Anämie oder starker Beschleunigung der Blutsenkung. Schon kleine Luftblasen, Trübung durch lipämisches Plasma oder residuale Erythrozyten liefern irreführende (meist pathologische) Ergebnisse. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die große Menge (20 ml) an Blut die man für die Herstellung von PRP benötigt. Dies ist besonders problematisch bei Säuglingen oder kleinen Kindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Thrombozytenfunktionstestung die Methode der Impedanz-Aggregometrie angewendet. Diese Methode wurde 1980 von Cardinal und Flower beschrieben. Im Gegensatz zum lichtaggregometrischen Verfahren erfolgt der Nachweis der Thrombozytenaggregation bei der Vollblutaggregometrie in einer weitgehend physiologischen Umgebung der Blutplättchen mittels elektrischer Impedanzmessung. Die Methode benötigt keine Aufarbeitung (Zentrifugation) der Blutproben und kann wie die photometrische Aggregometrie mit der Luminometrie

kombiniert werden. Nach Eintauchen der Messvorrichtung in die mit Blut gefüllte Küvette bildet sich auf den Platinelektroden ein Monolayer von Thrombozyten aus, der zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstands führt. Bei Zugabe eines Agonisten lagern sich weitere Plättchen an und führen zu einer Veränderung der Impedanz zwischen den Elektrodendrähten. Die Veränderung des Widerstands dient als Prinzip der Impedanzmessung (siehe 3.2.5). Nachteil der Impedanzmessung gegenüber dem lichtaggregometrischen Verfahren ist, dass nach jeder Messung die Elektrode gereinigt werden muss, damit sich auf den Platinen keine Thrombozyten befinden.

Die Validität dieser Methode wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Challen et al., 1982; Ingberman-Wojenski et al., 1983; Lehman et al., 1985). Challen et al. quantifizierten 1982 die Thrombozytenmasse an der Platinelektrode während der Aggregationsmessung. Der Proteingehalt der Aggregate wurde dabei mit der Lowry-Methode geschätzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Masse an Protein in den Aggregaten mit der Menge an zugegebenem Agonisten korrelierte. 1983 zeigten Ingberman-Wojenski et al. mit Hilfe von <sup>125</sup>I-markierten Antikörpern gegen plättcheneigenes Glykoprotein IIB/IIIA, dass die Aggregation in Vollblut gleichzeitig einhergeht mit einer Freisetzung von ATP und dass der Impedanzanstieg zwischen den Elektrodendrähten direkt zusammenhängt mit der Anlagerung von Plättchen an eben diese Drähte. Elektronenmikroskopische Verfahren von Lehman et al. (1985) zeigten später ebenfalls, dass der initiale Impedanzanstieg auf das Anhaften der Thrombozyten an die Elektroden zurückzuführen ist.

Ein Vergleich der beiden Methoden (Riess et al., 1986) zeigt eine hohe Korrelation bei der Bestimmung der ADP- oder Kollagen-induzierten Plättchenaggregation. Weiterhin konnten Riess und Mitarbeiter zeigen, dass Plättchen im WB sensitiver als in PRP auf die aggregationsfördernden Substanzen Thrombin, Ristocetin und Arachidonsäure ansprechen und dass die Hemmung der Plättchenaggregation durch die einmalige orale Einnahme von Acetylsalicylsäure länger im WB nachgewiesen werden kann. ASS hemmt dabei die Plättchenaggregation deutlich in den Kollagen und Arachidonsäure-induzierten Messungen, aber nur wenig in den ADP-induzierten Messungen. Dies wird auf die hohe Potenz der Kollagenreagenz zurückgeführt (Ingberman-Wojenski et al., 1984), sowie die Fähigkeit der Impedanzmethode, selbst kleinste Plättchenaggregate



als Impedanzänderung aufzuzeichnen (Jones et al., 1985; Mackie et al., 1984; Mannucci et al., 1987).

## 1.4 Thrombozyten und ihre Rolle an der Pathophysiologie der KHK

### 1.4.1 Störung der Endothelfunktion – endotheliale Dysfunktion

Das Endothel mit einer Oberfläche von 1000 m<sup>2</sup> ist eine einlagige, kontinuierliche Zellschicht an der Innenwand der Gefäße, die das intravasale (Blut) vom interstitiellen Kompartiment trennt. Die Endothelzellen haben nicht nur eine Barrierefunktion, sondern produzieren neben wachstums- und matrixmodulierenden Substanzen (Moncada et al., 1979, 1991) auch vasoaktive Substanzen, wie Prostazyklin, den endothelium-dependent hyperpolarisation factor (EDHF) (Feletou et al., 1988) und den endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott et al., 1980). Die Abbildung 1 zeigt eine Übersicht zur Endothelfunktion.

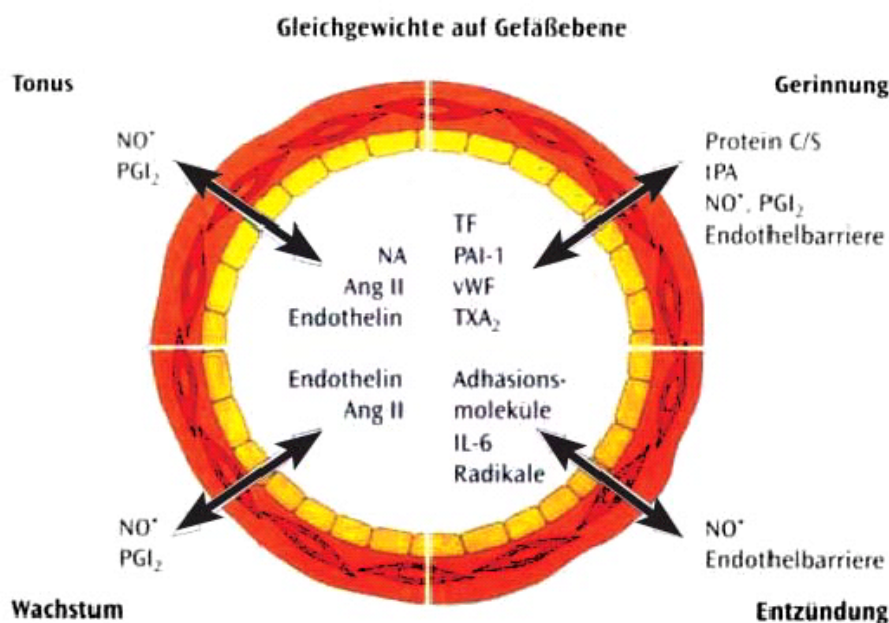


Abb. 1: Endothelfunktion (aus „Herz-Kreislauf transparent“, Aventis Pharma)

EDRF konnte in späteren Untersuchungen als Stickstoffmonoxid identifiziert werden (Gimbrone et al., 1999; Ludmer et al., 1986). Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die NO-Synthase (NOS) aus der Vorstufe L-Arginin gebildet (Palmer et al., 1987). NO ist eine vasodilatierende Substanz, die die Adhäsion von Monozyten und Leukozyten an das

Endothel, aber auch die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen verhindert. Weiter reduziert NO die Produktion freier Sauerstoffradikale und inhibiert die Oxidation von „low density lipoprotein-„ (LDL)-Cholesterin. Untersuchungen zeigen NO als ein potenter Inhibitor der Aggregation und Adhäsion der Plättchen (Radomski et al., 1987). Im Endothel werden außerdem eine Vielzahl weiterer physiologisch bedeutsamer Substanzen wie z.B. Angiotensin II, Bradykinin, Serotonin, ADP, Adenosin und Noradrenalin um- oder abgebaut. Über diese Substanzen steuert das intakte Endothel den Tonus der Gefäße, reguliert das Wachstum der Gefäße, moduliert die Zellmigration, strukturiert die extrazelluläre Matrix, beeinflusst das Wachstum von glatten Muskelzellen und hemmt die Thrombozyten- und Monozytenadhäsion sowie ihre Aggregation (Moncada et al., 1993; Vane et al., 1990). Zusammen mit der Hemmung des programmierten Zelltodes wirken alle diese Faktoren antiatherosklerotisch (Haendeler et al., 1999).

Durch Verletzungen, Entzündungen oder kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Rauchen, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus, verliert das Endothel die protektiven Eigenschaften und entwickelt sogar proarteriosklerotisches Potential. Diese Situation wird klinisch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Hämodynamisch äußert sich die endotheliale Dysfunktion durch einen Verlust der endothelabhängigen Relaxation, bedingt durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO. Ohara et al. (1993) und Münzel et al. (1995, 1997) konnten zeigen, dass die eingeschränkte Bioverfügbarkeit des NO durch eine erhöhte Bildung von Superoxidanionradikalen bedingt ist. Die Superoxidanionradikale können NO inaktivieren. Neuere Untersuchungen zeigen, dass durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) selbst Superoxidanionradikale gebildet werden, wenn der Co-Faktor Tetrahydrobiopterin oder das Substrat L-Arginin für die NO-Synthese fehlen (Gori et al., 2001; Vasquez-Vivar et al., 1998).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine vermehrte Inaktivierung von endothelalem NO durch  $O_2^-$  eine wesentliche Komponente der endothelialen Dysfunktion darstellt. Diese NO/ $O_2^-$ -Imbalance, ausgelöst durch die bekannten Risikofaktoren, aktiviert im Endothel ein proatherosklerotisches Potential, was die Entstehung und Progression vaskulärer Prozesse von Atherosklerose, Thrombose, Vasospastik und Plaqueruptur begünstigt.

### **1.4.2 Einfluss der Thrombozyten auf die Atherogenese und Progression der Atherosklerose**

Grundlage des heutigen Verständnisses der Atherogenese ist die response-to-injury-Hypothese (Ross et al., 1993). Eine chronische Gefäßschädigung, Entzündung oder kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Rauchen, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus, führen zur endothelialen Dysfunktion. Die Folge ist eine vermehrte Monozyten/Lymphozyten-Adhäsion und Einwanderung dieser Zellen in die Intima. Weiter kommt es zu einer intimalen Lipideinlagerung. Diese Lipideinlagerungen sind reich an oxidierten LDL-Partikeln und werden von Monozyten phagozytiert. Durch die Phagozytose wandeln sich die Monozyten in Schaumzellen um. Diese sammeln sich zunächst diffus und dann herdförmig an und bilden so eine Lipidplaque. Über die Lipidplaque kann das Endothel abgesichert werden. Die Folge ist die Ausbildung eines Plättchenthrombus mit Gefäßstenosierung und Freisetzung thrombozytärer Wachstumsfaktoren. Es wird der Plättchenwachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor) aus den Thrombozyten freigesetzt, der proliferationsfördernde und chemotaktische Wirkungen auf Muskelzellen und Fibroblasten besitzt. Plaquemakrophagen sezernieren proliferationsfördernde Faktoren, wie Endothelin-1. Es bildet sich eine fibröse Plaque, in deren Zentrum sich ein nekrotischer Kern befinden kann. Eine Plaque kann über viele Jahre stabil bleiben, ohne Komplikationen zu verursachen. Eine Zunahme der entzündlichen Aktivität, übermäßige mechanische Beanspruchung (Hypertonie) oder durch Apoptose von Monozyten und/oder glatten Muskelzellen (Bauriedel et al., 1999) kann es im weiteren Verlauf zu einem Verlust der Festigkeit der Plaque kommen. Man spricht dann von einer instabilen Plaque. Durch Proteinasen, die aus den Schaumzellen freigesetzt werden, kann es dann zum Einreißen der Gewebedecke kommen (Plaquesfissur). Dies führt zu Einblutungen in die Plaque, mit anschließender intramuralen Gerinnselbildung („intraintimaler Thrombus“) durch Plättchenaktivierung und Thrombinbildung. Reißt die Plaquesfissur weiter ein, entsteht das atherosklerotische Ulcus. Auf diesem Ulcus kann sich ein Thrombus bilden, der zu einer Stenosierung oder zum vollständigen Verschluss (Herzinfarkt) des betroffenen Gefäßes führt. Auch ein asymptomatischer Aufbruch eines Atheroms führt durch Förderung der entzündlichen und proliferativen Reaktion zu einer schnellen Progression der Läsion und zu einer weiteren Verengung des Gefäßes.

Pathophysiologisch gesehen ist der zentrale Auslösemechanismus der Intimaveränderung die Monozyten- und Lymphozytenchemotaxis sowie die Bildung von Schaumzellen („foam cells“) durch Phagozytose von oxidierten LDL-Partikeln. Der Auslösemechanismus für die Einwanderung der Monozyten in die Gefäßwand ist jedoch weitestgehend ungeklärt. Der Einfluss von aktivierten Thrombozyten wird vermutet. So konnten Gawaz et al. (1998) und Henn et al. (1998) zeigen, dass aktivierte Thrombozyten entscheidend die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen verändern können. Man geht davon aus, dass besonders im Bereich von veränderten Scherkräften (Gefäßaufzweigungen) die Thrombozyten kurzfristig aktiviert werden und es dadurch zur Freisetzung von potenten zytokinähnlichen Substanzen (Interleukin-1, CD40-Ligand) kommt. Dies führt in den Endothelzellen und in den glatten Muskelzellen zur Sekretion von chemotaktischen Substanzen wie „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) und zur Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1, welche wichtige Rezeptoren für die Monozytenadhäsion darstellen. MCP-1 kommt besonders in atherosklerotischen Läsionen vor und ist ein wesentlicher chemotaktischer Faktor für Monozyten. Auch wird der macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) vermehrt aus geschädigten Endothelzellen (Rose et al., 1992) freigesetzt und steigert die Aktivität von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques. So konnte an Knock-out-Mäusen, die kein M-CSF bilden, gezeigt werden, dass sie trotz erhöhter Cholesterinspiegel keine atherosklerotischen Veränderungen entwickeln (Smith et al., 1995). An der thrombozytengesteuerten endothelialen Bildung von MCP-1 und ICAM-1 ist der Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) entscheidend beteiligt. NF- $\kappa$ B, die Adhäsionsrezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 und auch der chemotaktische Faktor MCP-1 wurden in sehr hohen Konzentrationen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen (Brand et al., 1996; Cybulsky et al., 1991; Nakai et al., 1995). Die aktivierten Thrombozyten stimulieren das NF- $\kappa$ B System und induzieren die Transkription NF- $\kappa$ B-regulierter Genprodukte. Es steigt in der Folge der Spiegel an Entzündungsmediatoren, wie Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon, an. Außerdem aktivieren die Thrombozyten die Migration glatter Muskelzellen über einen PDGF-abhängigen Mechanismus. Diese experimentellen Befunde zeigen, dass in der Umgebung eines plättchenreichen Thrombus oder nach dem Kontakt der aktivierten Thrombozyten mit der intakten Gefäßwand inflammatorische Veränderungen in den

Endothelzellen induziert werden, die in Folge der Monozyteneinwanderung mit nachfolgender Umwandlung in Schaumzellen und durch die Migration glatter Muskelzellen (Proliferation der Intima) einen atherogenen Prozess begünstigen.

Es gilt festzuhalten, dass herkömmliche antithrombozytäre Substanzen, wie Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridine oder GPIIb-IIIa-Antagonisten zwar diskrete Funktionen der Thrombozyten beeinflussen, aber die Freisetzungsreaktion der aktivierten Thrombozyten und somit die potentiell atherogenen Mechanismen weitestgehend unbeeinflusst lassen. In einer prospektiven, randomisierten Doppelblindstudie zur Beeinflussung der Progression der Atherosklerose durch ASS, konnte Ranke et al. (1993) einen positiven Einfluss auf atherosklerotische Plaques im Bereich der Karotiden nach einer einjährigen Therapie mit hochdosierter ASS (900 mg/Tag) im Vergleich zu niedrigdosierter ASS (50 mg/Tag) zeigen. Eine Beeinflussung der Progression der Atherosklerose konnte nur für die hochdosierte ASS-Dosis gezeigt werden. Ebenfalls nur bei hoher Dosis zeigte sich eine vollständige Rückbildung der Plaques (9 von 55), wobei diese sich auf weiche und ulzeröse Plaques beschränkte. Als Ursache wurde die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Endothelzellen vermutet, die durch eine hohe ASS-Dosis ausgelöst werden kann. Vor dem Hintergrund der jüngsten experimentellen Befunde über die plättcheninduzierten atherogenen Mechanismen, eröffnet sich durch eine gezielte und effektive Beeinflussung plättchengesteuerter Prozesse im Bereich der betroffenen Gefäßwand ein interessanter pharmakologischer Ansatzpunkt zur Behandlung von Patienten mit hohem atherogenem Risiko.

#### **1.4.3 Die Rolle der Thrombozyten beim akuten Koronarsyndrom (ACS)**

Unter dem Begriff akutes Koronarsyndrom (ACS) werden die instabile Angina pectoris (IAP), der Nicht-ST-Streckenhebungs-Infarkt (NSTEMI), auch nicht- transmuraler Myokardinfarkt genannt, und der ST-Streckenhebungs-Infarkt (STEMI) zusammengefasst. Pathophysiologisch liegt eine akute oder subakute Verringerung der myokardialen Sauerstoffversorgung zugrunde. Ursache hierfür ist in der Regel eine Ruptur einer atheromatösen Plaque bei vorbestehender stenosierender Atheromatose (Davies et al., 1985), die zu einer begleitenden Entzündung, Vasokonstriktion und nachfolgender Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung führt. Im Gegensatz

hierzu steht die stabile AP, die durch eine stabile atherosklerotische Gefäßeinengung zu einer verringerten Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes führt. Entscheidende Faktoren für die Langzeitprognose nach akutem Myokardinfarkt sind: 1. die Dauer des thrombotischen Gefäßverschlusses, 2. eine effektive und lang anhaltende Wiedereröffnung der Infarktarterie, 3. die Verhinderung eines größeren Myokardverlustes und eines ventrikulären Remodelings sowie 4. die Beherrschung rhythmogener Komplikationen (Kelm et al., 2000). Diese Faktoren bestimmen nicht nur die kardiovaskuläre Mortalität, sondern auch die Lebensqualität nach dem Infarkt (Coyne et al., 2000).

Pathologisch weisen die rupturgefährdeten instabilen Plaques einen besonders lipidreichen Kern (hohe Konzentration von Cholesterylestern) auf, der von einer fibrösen Schicht („fibrous cap“) umgeben ist. Zu einer Plaqueruptur kann es durch veränderte Scherkräfte, z. B. durch einen erhöhten Blutstrom und Gefäßwandspannung bei körperlicher Anstrengung kommen. Eine weitere Ursache ist die biologische Veränderung der Plaque. Hierbei kommt es zur Einwanderung von Monozyten in den Plaquebereich mit anschließender Makrophagendifferenzierung, Phagozytoseaktivität und Sekretion von proteolytischen Enzymen (Plasminogenaktivator, Metalloproteinasen) die zu einer Instabilität der Plaques führen.

Die Thrombozyten spielen in der Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome eine zentrale Rolle. Sie sind neben der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses an der Mikroembolisation und Vasokonstriktion, Plaqueprogression und systemischen Entzündungsreaktion beteiligt. Untersuchungen von Fitzgerald et al. (1986) und Willerson (1989) zeigten, dass Patienten mit instabiler Angina pectoris bei auftretenden ischämischen AP-Attacken eine erhöhte Thromboxanbildung aufweisen, die für eine erhöhte Aktivierung zirkulierender Thrombozyten spricht. Maseri et al. (1998) zeigte, dass es durch die Freisetzung von Serotonin und Thromboxan A<sub>2</sub> aus den aktivierten Thrombozyten im Bereich der thrombotischen Plaques (siehe Abb. 2) oder in peripheren embolisierten Gefäßabschnitten zu transienten Koronarspasmen kommt, die zu nachfolgender Minderperfusion und Gewebeischämie des betroffenen Myokards führen. So kann es trotz offener Hauptgefäße zu kleinen Myokardischämien („minor myocardial injury“) mit Anstieg der Troponinserumwerte bei normalen CK-Werten kommen, was für den klinischen Verlauf prognostisch ungünstig ist.

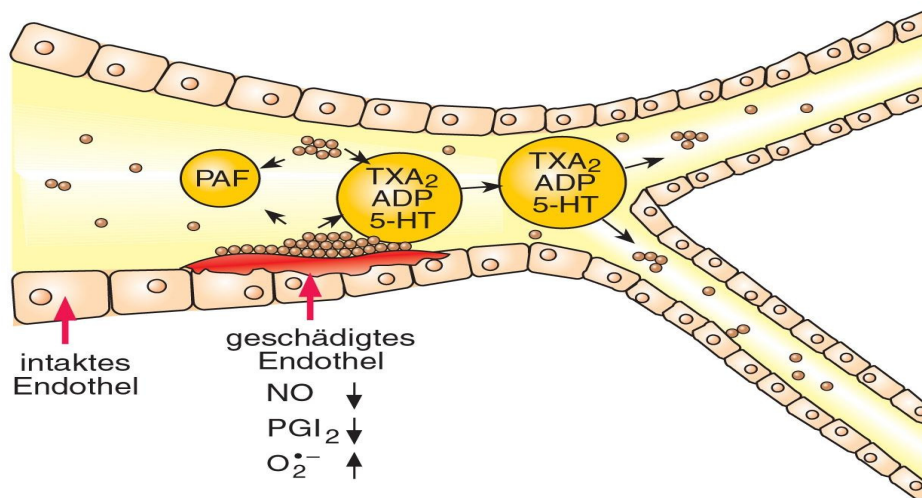


Abb. 2: Aktivierte Thrombozyten

Durch die myokardiale Ischämie kommt es zu einer vermehrten Synthese von  $\text{TNF-}\alpha$  (Gurevitch et al., 1996) und von Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin-6 (IL-6) (Biasucci et al., 1999; Entman et al., 1993; Ghaisas et al., 1997), wodurch es zu einer vermehrten Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber kommt. Die Plasmakonzentration von MCP-1 ist ebenfalls bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht. MCP-1 induziert die Synthese von „tissue factor“ durch die Thrombozyten (Schechter et al., 1996), was konsekutiv zu einer weiteren Steigerung der Thrombinsynthese und der Thrombozytenaggregation führt und somit einen Circulus vitiosus auslöst. Die Konzentrationserhöhung von  $\text{TGF-}\beta$  ist wahrscheinlich durch eine vermehrte Synthese in Monozyten und Endothel begründet.  $\text{TGF-}\beta$  wirkt protektiv bei der Reperfusion eines Myokardinfarktes, da es die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel hemmt (Lefer et al., 1993). Anhand der IL-6-Konzentration kann bereits bei asymptomatischen Patienten ein Risiko-Score für die Entwicklung eines Myokardinfarktes abgeschätzt werden (Ridker et al. 2000).

Patienten mit Angina pectoris und erhöhten CRP-Spiegeln profitieren von einer antithrombozytären Therapie mit ASS (Liuzzo et al., 1994; Ridker et al., 1997).

Die Bildung eines intravasalen Thrombus im Bereich der rupturierten Plaques unterteilt man in die drei Schritte: *Initiation*, *Amplifizierung* und *Fibrinbildung*. In der Initiationsphase kommt es zur Aktivierung (Thromboxanbildung, ADP-Freisetzung,

Fibrinogenrezeptoraktivierung) von den an die Gefäßläsion adhärierten Thrombozyten. Weiter kommt es durch die „tissue factor“-reichen Plaquearealen zur Bildung eines TF-VIIa-Komplexes, was durch die Aktivierung von Faktor X und IX zur Bildung von Thrombin und so zu einer Rekrutierung weiterer Thrombozyten an die adhärenen Thrombozyten führt. Thrombin induziert weiter die Anlagerung der Gerinnungsfaktoren V und VIII an die Thrombozytenoberfläche (Amplifizierung). Durch die Bildung prokoagulatorischer Faktoren-Komplexe (Tenase- und Prothrombinasekomplex) auf der aktivierten Thrombozytenmembran und auf abgescherten Mikropartikeln, wird die Thrombinbildung katalysiert und die Fibrinbildung induziert (Phase der Fibrinbildung). Im Rahmen der Thrombozytenaggregation an die vulnerablen Plaques kommt es in einer Vielzahl der Fälle nicht zum vollständigen Gefäßverschluss, sondern es finden sich klinisch inapparente murale Thrombozytenaggregate. Diese können sich entweder spontan auflösen oder werden während vaskulärer Reparaturarbeiten organisiert und fördern die Progression der Koronarplaques. Die Anlagerung der Thrombozyten an die vulnerablen Plaques ist abhängig von ihrer Zusammensetzung. Eine besonders starke Thrombozytenauflagerung findet sich im lipidreichen atherosklerotischem Gewebe. Dies ist auf den hohen Gehalt an „tissue factor“ zurückzuführen. Daraus ergibt sich als Akuttherapie, die Verhinderung eines weiteren Thrombuswachstums und die komplette und stabile Wiedereröffnung des Koronargefäßes und somit den Erhalt der linksventrikulären Funktion.

Vor diesem Hintergrund erhalten die gezielte Umstellung der Ernährung (de Lorgeril et al., 1999; Kraus et al., 2000), eine gesteigerte kardiorespiratorische Fitness (Myers et al., 2002) und besonders die medikamentöse Prävention eine besondere Bedeutung, um die alleine in Deutschland bis zu 400.000 zählenden ACS zu verhindern. So muss insbesondere die Verhinderung der Progression der Atherosklerose und die Stabilisierung der Plaques, sowie die Verhinderung der Plättchenaggregation ein zentraler Angriffspunkt in der Therapie des kardiovaskulär erkrankten Risikopatienten sein, um die kardiovaskulären Ereignisse zu reduzieren.

#### **1.4.4 Therapie der Atherosklerose**

Die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen ist ein lebenslanger Prozess, der bereits im Jugendalter beginnt. Deshalb ist eine gezielte Aufklärung (Ernährung, Fitness) und



eine frühe medikamentöse Intervention nötig, um diesen Prozess und die Komplikationen der Atherosklerose zu stoppen.

Wie bereits unter 1.4.3 erwähnt, reduziert eine gezielte Umstellung der Ernährung die kardiovaskulären Ereignisse deutlich. Die American Heart Association (AHA) hat Vorschläge für eine gesunde Ernährung erarbeitet. Die Eckfeiler sind eine Reduktion des Fettanteils auf  $\leq 30\%$  (Anteil gesättigter Fettsäuren  $< 10\%$ ) der Gesamtkalorien sowie eine reduzierte Cholesterinmenge von  $< 300$  mg. Es gilt als gesichert, dass ungünstige Lipidspiegel mit erhöhten LDL-Cholesterin- und erniedrigten HDL-Cholesterinwerten an der Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques beteiligt sind (Wood et al., 1998). Empfohlen werden die Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die die Entwicklung atherosklerotischer Plaques verhindern können (Krauss et al., 2000). Dies gilt besonders für die  $\omega$ -3-Fettsäuren, die außerdem zur elektrischen Stabilisierung des Myokards führen und somit zur Reduktion des plötzlichen Herztodes bei Postinfarktpatienten beitragen (Albert et al., 2002). Der Einfluss der körperlichen Fitness hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. So konnte gezeigt werden, dass die in Belastungstests objektiv messbare kardiorespiratorische Fitness beim Gesunden umgekehrt proportional mit der Häufigkeit von künftigen kardiovaskulären Erkrankungen verbunden ist (Lee et al., 1999; Myers et al., 2002). Myers et al. (2002) zeigte, dass die Senkung des kardiovaskulären Risikos durch die körperliche Fitness unabhängig ist von weiteren Risikofaktoren. In angiographischen Messungen konnte Nierbauer et al. (1997) für Patienten mit nachgewiesener KHK eine Progressionsverlangsamung der Erkrankung unter körperlichem Training nachweisen.

In der medikamentösen Beeinflussung der Progression der Atherosklerose spielen die Cholesterinsynthese-Hemmer (Statine) eine zentrale Rolle. Sie sind zurzeit die wirksamsten Medikamente zur Senkung erhöhter LDL-Cholesterinwerte (Cullen et al., 2000). Weiter senken sie die Werte des C-reaktiven Proteins (CRP) um 15-20% (Jr. Gotto et al., 2001; Ridker et al., 2001), führen zu einer Plaquestabilisierung sowie zu einer funktionellen Erholung der Gefäße (Jr. Gotto et al., 2001; Scharf et al., 2001; Williams et al., 1998). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Statine bei Patienten mit klinisch manifester KHK (LIPID, 1998; 4S, 1994) und bei Patienten mit noch nicht diagnostizierter KHK (Shepherd et al., 1995) die Endpunkte kardialer Tod, Myokardinfarkt und Apoplex um bis zu 20-30% senken.

Für die Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) konnte bei Patienten mit bekannter KHK eine protektive Wirkung gezeigt werden (Jr. Smith et al., 2001). Für ASS ist eine irreversible Acetylierung der Cyclooxygenase und damit eine Hemmung der Thromboxan A<sub>2</sub> Bildung bekannt (Stein et al., 1989). So wird durch die tägliche Dosis zwischen 75 und 325 mg das Ereignisrisiko um 25% gesenkt (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). Für ASS konnte in fünf randomisierten Studien gezeigt werden, dass auch die Gabe bei Primärprävention zu einer Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse zwischen 4 und 44% zu Folge hat (Lauer et al., 2002). Da jedoch auch die Rate der Blutungskomplikationen ansteigt, ist die Therapie zur Primärprävention nur für Patienten mit erhöhtem Koronarrisiko sinnvoll. Liegt eine ASS-Unverträglichkeit vor, kann die Therapie mit Clopidogrel 75 mg/d durchgeführt werden (Jr. Smith et al., 2001). Clopidogrel ist ein Thienopyridinderivat, welches die durch Adenosindiphosphat (ADP)-induzierte Thrombozytenaggregation hemmt. Die Substanz ist gut verträglich und ist in der Sekundärprävention wirksamer als ASS (CAPRIE, 1996), allerdings bei höheren Kosten (Gaspoz et al., 2002). Die CURE-Studie (2001) zeigte für die Kombinationstherapie Clopidogrel (75 mg/d) plus ASS (75-325 mg/d) bei Patienten nach einem Akuten Koronarsyndrom eine relative Risikoreduktion von 20%, gegenüber der Standardtherapie mit ASS (75-325 mg/d).

Für ACE-Hemmer konnte eine antiatherosklerotische Wirkung nachgewiesen werden (Lonn et al., 2001; Yusuf et al., 2000). So wurden in der HOPE-Studie knapp 9300 Patienten  $\geq 55$  Jahren mit einem erhöhtem kardiovaskulären Risiko über 5 Jahre randomisiert mit Ramipril, Vitamin E oder Placebo behandelt. Diese Studie wurde vorzeitig beendet, weil Ramipril die Rate „harter“ Ereignisse um relative 22% von 18% auf 14% senkte, unabhängig von der Vormedikation mit Betablocker, ASS oder Lipidsenkern. Die Vitamintherapie blieb ohne Effekt. Als Korrelat der Ereignisreduktion konnte für Ramipril eine verlangsamte Progression der Atherosklerose bzw. der Intima-Media-Dicke der Karotis, unabhängig von der Blutdrucksenkung, nachgewiesen werden (Lonn et al., 2001). Die antiatherosklerotische Wirkung von Ramipril kann über die Antagonisierung der atherogenen Wirkung von Angiotensin im Gewebe erklärt werden (siehe 4.4.3). Ein weiterer wichtiger Mechanismus dürfte in der Verbesserung der Endothelfunktion bei gesteigerter Verfügbarkeit von Stickoxid sowie in einer antioxidativen Wirkung liegen (Münzel et al., 2001). Ramipril ist nach den Statinen die

Substanz, für die eine antiatherosklerotische Wirkung am Besten gesichert ist. In einer Studie mit 6100 Patienten zur Sekundärprävention des Schlaganfalls senkte die Kombination von Perindopril und Indapamid das Risiko eines erneuten Inuslts um 43% (PROGRESS Collaborative Group, 2001).

Dass auch die AT1-Rezeptorantagonisten die Progression der Atherosklerose bzw. die Komplikationen der atherosklerotischen Plaquebildung günstig beeinflussen können, zeigt die LIFE-Studie (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension) (Dahlöf et al., 2002). Hier wurden blutdruckunabhängige Effekte von Losartan auf die Häufigkeit von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit arterieller Hypertonie und linksventrikulärer Hypertonie untersucht. In dieser randomisierten Studie mit 9200 Patienten wurde ein Vergleich mit dem Betablocker Atenolol durchgeführt. Es zeigte sich nach einer ca. 4jährigen Therapie eine 13%ige Reduktion des primären Endpunktes gegenüber Atenolol, obwohl die Senkung des arteriellen Blutdrucks fast identisch war. Dieser Erfolg war auf die 25%ige Reduktion zerebrovaskulärer Ereignisse zurückzuführen, während die kardiovaskulären Ereignisse nahezu unverändert blieben.

Prospektive randomisierte Studien zur Vitaminapplikation (Vitamin C, E,  $\beta$ -Carotin, Selenium) bei Hochrisikopatienten, zeigten keinen signifikanten Effekt (Brown et al., 2001; HOPE, 2000). Ebenfalls keinen günstigen Effekt konnte für die Hormonsubstitution bei postmenopausalen Frauen gefunden werden (Hulley et al., 1998; Women's Health Initiative, 2002). Für die Gabe von Vitamin B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> und Folsäure, konnte eine Senkung des Homozysteinspiegel gezeigt werden. Es zeichnet sich hierdurch ein günstiger Behandlungseffekt ab (Fairfield et al., 2002), wobei entsprechende Langzeitdaten noch ausstehen.

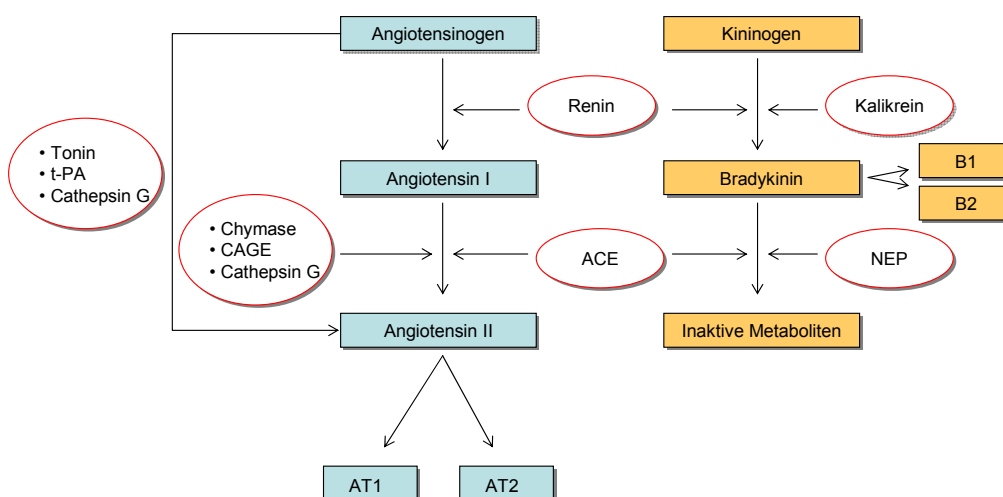
Festzuhalten gilt, dass, auch wenn nicht alle Mechanismen der Wirkung der einzelnen Medikamente geklärt sind, Statine, ASS, Clopidogrel, ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten die Medikamente mit erwiesener Wirksamkeit in der Therapie der Atherosklerose sind.

## 1.5 Das Renin-Angiotensin-System

### 1.5.1 Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems (RAS)

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eine Kaskade proteolytischer Aktivierungen (siehe hierzu Abb. 3). Angiotensin II kann sowohl als zirkulierendes Hormon, als auch lokal gebildet als ortsständiger Faktor wirken. Renin wurde 1898 beschrieben, nachdem Tigerstedt und Bergmann nach Injektion eines Kaninchennierenextrakts eine Blutdrucksteigerung in Kaninchen registrierten. Im neutralen pH-Bereich ist Renin am aktivsten und weist eine sehr hohe Substratspezifität gegenüber Angiotensinogen auf, was derzeit als einzig bekanntes Substrat für Renin gilt. Renin wird in den Granula des juxtaglomerulären Apparats der Niere gebildet und gespeichert. Der juxtaglomeruläre Apparat befindet sich am Glomerulum der Niere, wo afferente und efferente Arteriolen des Nephrons eng beieinander verlaufen. Die Freisetzung wird durch eine niedrige Natriumionenkonzentration und durch akutes Absinken des mittleren renalen Blutdrucks unter 90 mmHg gesteuert. Stimulation von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren führt zu Verschiebung der Blutdruckschwelle zu höheren Werten, ab der die Reninsekretion steigt. Über  $\beta$ 1-Adrenozeptoren wird die basale Reninsekretion erhöht. Generell lässt sich das Prinzip der Renin-Freisetzung zweifach beschreiben: 1. Renin wird zum Schutz des Volumens der Extrazellulärflüssigkeit oder des lokalen Blutflusses freigesetzt. 2. Die Renin-Freisetzung wird durch Vasokonstriktoren und Volumenexpansion der Extrazellulärflüssigkeit gehemmt. Interessant ist die Tatsache, dass Angiotensin II selbst durch einen negativen Feedback-Mechanismus die Freisetzung von Renin hemmen kann. Das *Angiotensinogen* ist ein glykosyliertes  $\alpha$ 2-Plasmaglobulin. Es wird hauptsächlich in der Leber und Fettgewebe synthetisiert, obwohl sich mRNA und Protein auch in anderen Organen wie Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere, Eierstöcke und Hoden finden (Campbell et al., 1986/1987; Cassis et al., 1988). Renin spaltet im Plasma aus Angiotensinogen das Angiotensin I ab, welches dann durch das *Angiotensin-Konversionsenzym* (ACE) proteolytisch um zwei Aminosäuren zum Oktapeptid Angiotensin II verkürzt wird. Einen Stimulus für die Bildung von Angiotensinogen und seine Freisetzung bildet die bilaterale Nephrektomie, Glukokortikoide, Östrogene, Schilddrüsenhormone und Angiotensin II. Das ACE ist eine Dipeptidylcarboxypeptidase und für die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II verantwortlich. ACE ist ein

relativ unspezifisches Enzym und kann auch Enkephaline, Substanz P und das LH (Luteinisierendes Hormon, Lutropin)-freisetzende Hormon LH-RH (Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon), sowie die  $\beta$ -Kette von Insulin abbauen. Zusätzlich spaltet ACE das C-terminale Dipeptid von Bradykinin ab und deaktiviert dieses so. Bradykinin verursacht eine Vasodilatation durch Stimulation der NO-Produktion und eine Natriuresis durch direkten tubulären Effekt (Piepho et al., 2000). Das ACE tritt hauptsächlich im Gefäßendothel auf (Caldwell et al., 1976 und Rogerson et al., 1992). Weiter findet man es in den Epithelzellen der Nieren, auf dem Bürstensaum der proximalen Tubuli (Skidgel et al., 1987), in der Mitral- und Trikuspidalklappe des Herzens, in der Nierenrinde und dem Nebennierenmark, in spezifischen Hirnregionen (Chai et al., 1987 und Paul et al., 1985) und den Fortpflanzungsorganen (Rix et al., 1981). Das ACE-Gen konnte aus Lunge und Hoden kloniert und seine Nukleotidsequenz bestimmt werden. Eine Verbindung zwischen Mutation des ACE-Gens und der Entstehung der Hypertonie konnte bisher noch nicht zweifelsfrei belegt werden, aber es konnte einen Zusammenhang zwischen der Mutation des ACE-Gens und des Herzinfarkttrisikos gezeigt werden (Cambien et al., 1992). Eine ACE-Induktion konnte Mendelsohn et al. (1982) für Glukokortikoide und Fyhrquist et al. (1980) für Captopril (ACE-Hemmer) zeigen.



**Abb. 3: Das RAS in der Übersicht und die ACE-unabhängige Bildung von Ang II**

Angiotensin II kann auch über andere Stoffwechselwege als die Umwandlung aus Angiotensin I und von anderen Enzymen als ACE synthetisiert werden (siehe Abb. 3).

Hierzu konnten die Substanzen Cathepsin G, CAGE (chymostatin-sensitive Ang II-generating enzyme), Tonin und den Tissue-Plasminogen-Aktivator (t-PA) identifiziert werden (Gibbons et al., 1994). Weiter konnte eine hochspezifische, Angiotensin II-generierende Chymase im menschlichen Herz (Urata et al., 1990) und in der Gefäßwand (Okunishi et al., 1984) identifiziert und charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass etwa 40% des Ang II unabhängig vom ACE gebildet wird (Hollenberg et al., 1998). Diese Befunde demonstrieren, dass eine komplette Blockade des RAS nicht durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer erreicht werden kann. Neuere Untersuchungen von Bader et al. (2001) zeigen in einem Tiermodell, dass das Gewebe von Herz, Niere, Gehirn und den Gefäßen alle Komponenten des RAS enthalten und so zu einer lokalen Produktion von Ang II fähig sind.

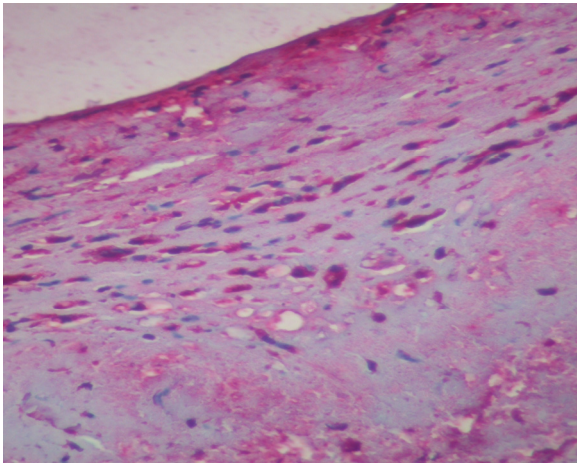
### 1.5.2 Angiotensin-II-Rezeptoren

Die bislang identifizierten Angiotensin-Rezeptorsubtypen werden als AT1- und AT2-Rezeptor bezeichnet (de Gasparo et al., 2002) und können anhand von neu entwickelten peptidischen und nicht-peptidischen Antagonisten charakterisiert werden. Eine Übersicht über die beiden Subtypen gibt die Tab. 1.

Tab. 1: Übersicht der Angiotensin-Rezeptoren

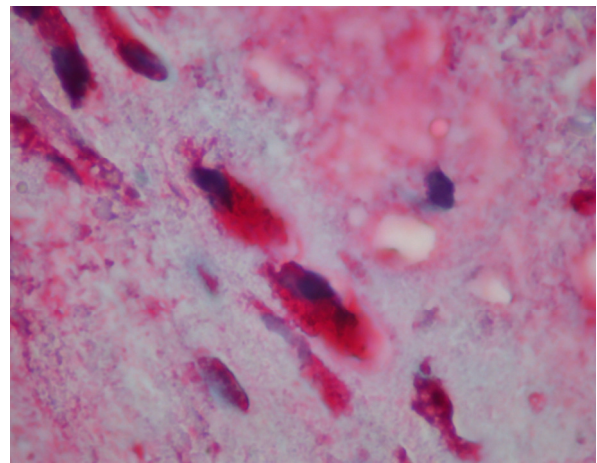
	AT1-Rezeptor	AT2-Rezeptor
Verteilung	Weitverbreitet in adulten Geweben wie z.B. Blutgefäßen, Niere, Nebenniere, Herz und Leber	Weitverbreitet in fetalen Geweben, auch exprimiert im adulten Gehirn, Nebenniere, Ovarien, Uterus, Gefäßendothel, Myokard
Funktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Vasokonstriktion</li> <li>○ kardiale Kontraktilität</li> <li>○ Aldosteron-Freisetzung</li> <li>○ Einfluss auf glomeruläre Filtration</li> <li>○ renaler Blutfluss</li> <li>○ kardiale und vaskuläre Hypertrophie</li> <li>○ zentrale Osmoregulation</li> </ul>	Mögliche Rolle in Wachstum und Entwicklung: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Antiproliferation,</li> <li>○ Hemmung der Neointimabildung</li> <li>○ Zelldifferenzierung</li> <li>○ Geweberegeneration</li> <li>○ Apoptose</li> </ul>
Struktur	7-Transmembran-Rezeptor G-Protein-Kopplung	7-Transmembran-Rezeptor G-Protein-Kopplung?
Liganden	Losartan, Valsartan, Irbesartan, Candesartan, Telmisartan, Eprosartan, Olmesartan	PD123177, CGP42112A, PD123319
Isoformen	AT1 <sub>1a</sub> , AT2 <sub>1b</sub> (Ratte, Maus)	

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, ist der AT<sub>1</sub>-Rezeptor für die kardioresnale Homöostase und die adaptive Zellproliferation verantwortlich. Die AT<sub>1</sub>-Rezeptoren lassen sich hauptsächlich im Gefäßmuskel (Dinh et al., 2001), aber auch in Niere, Nebenniere, Leber und Herz (siehe Abb. 4 und 5) nachweisen. Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor spielt bei der Kontrolle der Zellproliferation und/oder –differenzierung eine wichtige Rolle und ist weit verbreitet in fetalen Geweben, weshalb ihm hier Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse zugeschrieben werden. Schon wenige Wochen nach der Geburt finden in den meisten Gewebearten jedoch bedeutende Veränderungen im Verhältnis von AT<sub>1</sub>- zu AT<sub>2</sub>-Rezeptoren statt (Tsutsumi et al., 1991; Viswanathan et al., 1991).



**Abb. 4**

Die Abb. 4 zeigt eine mit AT<sub>1</sub>-Rezeptoren-Antikörper markierte degenerative Aortenklappe in der Übersicht. Arbeitsgruppe Prof. Bauriedel  
(immunhistochemische Färbung von Achim Viktor)



**Abb. 5**

Die Abb. 5 zeigt die mit dem AT<sub>1</sub>-Antikörper markierten Zellen in der Vergrößerung. Arbeitsgruppe Prof. Bauriedel  
(immunhistochemische Färbung von Achim Viktor)

Unter pathophysiologischen Bedingungen (z.B. Nierenversagen) und gewebsregenerativen Prozessen wie der Wundheilung, der Neointimabildung nach Gefäßverletzung (Pratt et al., 1989) und dem „Remodeling“ nach Myokardinfarkt (Nio et al., 1995) wird eine vorübergehend verstärkte Expression des AT<sub>2</sub>-Rezeptors, und in geringerem Ausmaße auch des AT<sub>1</sub>-Rezeptors, beobachtet. In vitro Studien haben gezeigt, dass die Stimulation des AT<sub>2</sub>-Rezeptors zur einer Wachstumshehmung von Kardiomyozyten und glatte Gefäßmuskelzellen führt (Henrion et al., 2001).

### **1.5.3 Aktuelle Vorarbeiten**

Meine Doktorarbeit, die ich von März 2004 bis Februar 2006 hinsichtlich des experimentellen Teils durchgeführt habe, bezieht sich inhaltlich und methodisch auf Vorarbeiten von Frau Melanie Schneider-Schmitt. Frau Schneider-Schmitt hatte in ihrer Doktorarbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe bis Anfang 2003 die Plättchenaggregation von Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie untersucht. So konnte sie als zentralen Befund ihrer Arbeiten zeigen, dass die Plättchenaggregation bei Patienten mit ACE-Hemmer-Einnahme gegenüber der unbehandelten Kontrollpatienten signifikant vermindert war (Bauriedel et al., 2003). Die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation war um 18% ( $p=0,025$ ), die ADP-induzierte Plättchenaggregation um 39% ( $p=0,039$ ) vermindert.

Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es, mögliche antiaggregatorische Effekte bei Einnahme von AT1-Rezeptorantagonisten zu untersuchen. Naturgemäß macht bei dieser Fragestellung ein direkter Vergleich mit ACE-Hemmern Sinn. Insofern wurden Aggregometrie-Daten von kardiovaskulären Patienten, die seinerzeit in der Arbeitsgruppe und damit auch von Frau Schneider-Schmitt erhoben worden waren (Originaldaten von < 90 Patienten), in der Statistik der hier vorliegenden Promotionsschrift mit berücksichtigt. Daraus resultierten härtere statistische Aussagen, insbesondere in den Subgruppen. Anführen möchte ich, dass mit Abwicklung der Fa. Nobis (Hersteller-Firma für Collagen und ADP) in die Fa. Probe & go Labordiagnostica GmbH zum 01.01.2003 modifizierte Reagenzien-Chargen mit veränderten Referenzbereichen der Meßwerte vorgegeben waren. Insofern konnten Messungen, die vor dem 01.01.2003 durchgeführt worden waren nicht in die vorliegende Promotionsschrift eingehen.

Nachgeordnetes Ziel meiner Untersuchungen war erstmals das Studium möglicher Einflüsse der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation sowie deren Modifizierung durch spezifische Medikamentengruppen.



## 2 Zielsetzung und Fragestellung

Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Hemmer und Angiotensin 1-Rezeptor-antagonisten sind Eckpfeiler in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie, der Herzinsuffizienz, der koronaren Herzkrankheit, dem akuten Myokardinfarkt, der diabetischen Nephropathie und in der Schlaganfallprävention. In mehreren randomisierten und Placebo kontrollierten Studien konnte eine Reduktion von kardiovaskulärer Mortalität, Myokardinfarkt und Schlaganfall für ACE-Hemmer (Flather et al., 2000; HOPE-Studie, 2000) und für AT1-Rezeptorantagonisten (Granger et al., 2003; LIFE-Studie, 2002) gezeigt werden. Die Autoren führen die günstigen Studienergebnisse nur partiell auf die blutdrucksenkende Eigenschaft des ACE-Hemmers bzw. des AT1-Rezeptorantagonisten zurück und postulieren weitere Effekte, wie eine Antagonisierung Angiotensin II-vermittelter Vasokonstriktion, eine verminderte Proliferation von Gefäßwandmyozyten sowie eine Abschwächung Plaquerupturbegünstigender Effekte. Die Autoren von LIFE führen die vaskuloprotektiven Effekte von Losartan auf eine Regression der linksventrikulären Hypertrophie zurück. Darüber hinaus wurde eine Verbesserung der endothelialen Funktion sowie ein stimuliertes endogenes Fibrinolyse-System diskutiert (Francis et al., 2000; HOPE, 2000). In einer neueren Untersuchung zu Losartan wurde gezeigt, dass der Losartan-Metabolit EXP3179 möglicherweise auch von der Blockade des AT1-Rezeptors unabhängige antiaggregatorische und antiinflammatorische Effekte besitzt (Krämer et al., 2002).

Vor diesem Hintergrund evaluiert die vorliegende Studie das therapeutische Potenzial der ACE-Hemmer und der selektiven AT1-Rezeptorantagonisten in Bezug auf ihre koagulatorische Aktivität. Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit Vollblutproben von Patienten mit/ohne koronare Herzerkrankung und/oder arterieller Hypertonie, die mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorantagonisten behandelt wurden. Diese wurden verglichen mit Proben unbehandelter Kontrollpatienten sowie mit Proben von Patienten mit ASS-Monotherapie oder ASS/Clopidogrel-Therapie. Weiter wurde der Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Vollblutaggregometrie als einfache, schnelle und sichere Methodik einen möglichen hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation unter Therapie mit AT1-

Rezeptorantagonisten nachzuweisen und einen eventuellen Unterschied zur Therapie mit einem ACE-Hemmer aufzuzeigen.

Um diese zentrale Fragestellung zu evaluieren, wurden folgende Einzelfragen formuliert:

- I. Welchen Einfluss haben Alter, Geschlecht, Laborwerte und die Therapie mit  $\beta$ -Blockern,  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten, Nitraten, CSE-Hemmern, Digitalis, Diuretika, Vitamin-K-Antagonisten und Heparin auf die Plättchenaggregation? Gibt es einen Unterschied in der Plättchenaggregation von Vene und Arterie?
- II. Ist die Plättchenaggregation bei Patienten mit den kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum verändert?
- III. Welchen Wert zeigt die Plättchenaggregation bei Therapie mit etablierten antithrombozytären Substanzen und wie ist die Wirksamkeit dieser Medikamente bei Patienten mit Nikotinkonsum und Diabetes mellitus?
- IV. Können antithrombotische Effekte unter der Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten gezeigt werden?
- V. Zeigt sich unter Neueinstellung mit Valsartan im Verlauf von vier Wochen eine Veränderung der Plättchenaggregation?
- VI. Kann in vitro eine Modulation der Plättchenaggregation durch die Rohsubstanz Valsartan nachgewiesen werden?
- VII. Gibt es Unterschiede zwischen der Therapie mit einem ACE-Hemmer und einem AT1-Antagonisten?
- VIII. Haben ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten Vorteile gegenüber der Therapie mit ASS bei Diabetikern?
- IX. Hat die Therapie mit einem ACE-Hemmer einen Einfluss auf die Plättchenaggregation von Patienten mit Nikotinkonsum?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Zur Testung von Einflussfaktoren auf die Thrombozytenfunktion wurde die Plättchenaggregation von 598 kardiovaskulären Patienten in verschiedenen Studienarmen untersucht. Diese Patienten wurden im Laufe von 24 Monaten aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universitätsklinik Bonn rekrutiert. Die untersuchten Patienten waren mindestens 30 Jahre alt. Zusätzlich mussten eine dokumentierte arterielle Hypertonie (systolisch >140 mmHg, diastolisch >90 mmHg), oder eine koronare Herzkrankheit (KHK), dokumentiert durch eine Koronarangiographie mit hämodynamisch relevanten Stenosen, oder beide Erkrankungen vorliegen. Patienten mit einem Alter von mehr als 80 Jahren oder instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkt in den letzten 3 Monaten, hämodynamisch relevante Herzklappenvitien, unkontrollierter Hypertonie oder Apoplex wurden ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten mit schwerer pulmonaler Erkrankung, schwerer Nierenerkrankung (Serumkreatinin >2 mg/dl) oder mit anderen schweren Erkrankungen, die das Überleben deutlich verkürzen würden. Das schriftliche Einverständnis der Patienten zur Teilnahme an den Untersuchungen lag vor. Ein positives Votum der Ethikkommission unserer Fakultät lag vor.

### **3.2 Testung der Thrombozytenfunktion mit der Vollblut-Lumi-Aggregometrie**

#### **3.2.1 Material**

Die Thrombozytenaggregation wurde mit einem Chrono-Log Vollblut-Lumi-Aggregometer der Firma Nobis Eendingen gemessen (siehe Abb. 6). Dieses Aggregometer erlaubt die Messung der Impedanz, über die die Stärke der Thrombozytenaggregation bestimmt wird (siehe 1.3). Wir setzten ein 4-Kanal-Gerät (Modell 590-4D) ein mit Analog- und Digitalausgang und PC-Steuerungssoftware unter MS-Windows©. Um Fehlerquellen auszuschließen, bezogen wir sämtliches Zubehör von der gleichen Firma (Probe & go Labordiagnostica in Eendingen). Hier konnten Coller und

Gralnick 1976 zeigen, dass kleinste Unterschiede in Größe oder Länge der Rührstäbchen und Küvetten bereits zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Für die Messungen verwendeten wir Chrono Log 1 ml Polystrolküvetten sowie silikonisierte Einmal-Rührstäbchen für Polystrolküvetten.

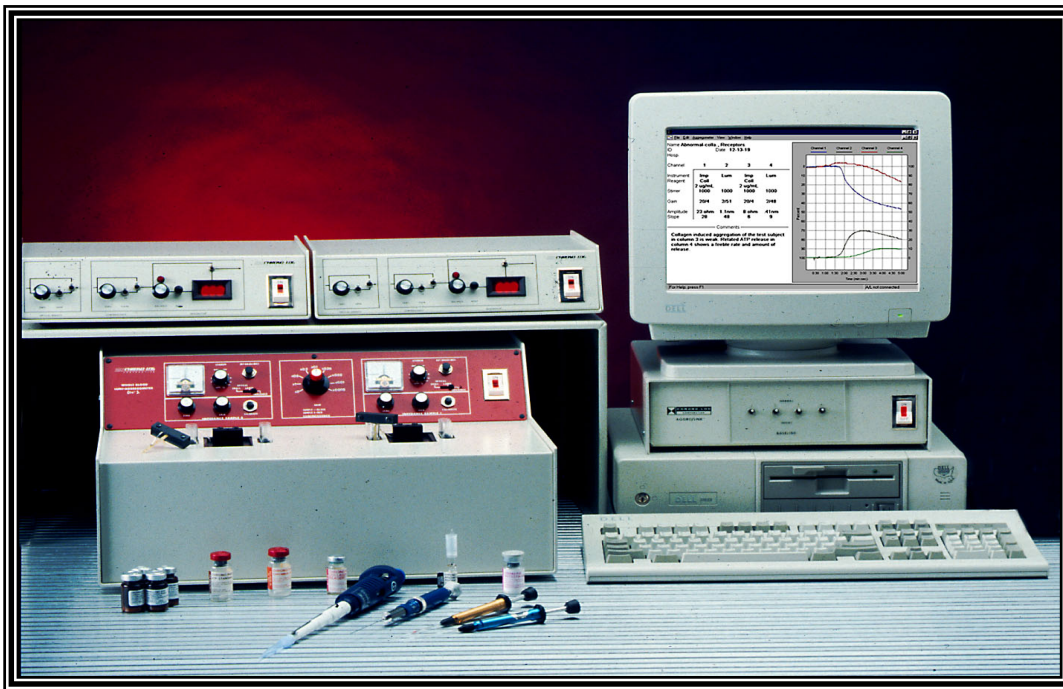


Abb. 6: Aufbau des Vollblut-Lumi-Aggregometer (Fa. Chrono Log)

### 3.2.2 Reagenzien

**ADP-Reagenz** (Probe & go, Endingen): ADP wurde als Trockensubstanz gekühlt bei  $-20^{\circ}\text{C}$  angeliefert. Durch leichtes Klopfen des Fläschchens wurden die ADP-Kristalle auf den Boden des Fläschchens gebracht und dann mit Hilfe von 5 ml physiologischer Natriumchlorid-Lösung zu einer Endkonzentration von 1 mmol rekonstituiert. Die Stammlösung wurde zu 20  $\mu\text{l}$  in Tubes abgefüllt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf einzeln aufgetaut.

Durch Mischung von 1  $\mu\text{l}$  Stammlösung mit 1 ml Probe ergibt sich eine 1  $\mu\text{molare}$  Lösung im Ansatz. Normale Aggregation und ATP-Freisetzung treten bei 5 bis 20  $\mu\text{molaren}$  Lösungen auf.

**Kollagen-Reagenz** (Probe & go, Endingen): Die Reagenz wird als gebrauchsfertige Suspension gekühlt bei  $+4^{\circ}\text{C}$  bis  $+8^{\circ}\text{C}$  ausgeliefert. Die Suspension besteht aus nativen

Kollagenfibrillen Typ I aus Pferdesehnen in isotonischer Glucoselösung mit einem pH-Wert von 2,7.

Durch Mischung von 1 µl Kollagen mit 1 ml Probe ergibt sich eine Endkonzentration von 1 µl/ml Kollagen im Ansatz. Normale Aggregation und ATP-Freisetzung treten bei Endkonzentration von 2 bis 5 µl/ml auf. Nicht verbrauchtes Kollagen-Reagenz kann bei +4°C bis +8°C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Das Kollagen-Reagenz darf nicht eingefroren werden.

Die Keimarmut der beiden Lösungen wurde zum einen durch ihren niedrigen pH-Wert und die vorgeschriebene Kühlung erreicht, zum anderen durch ausschließliches Verwenden von Einmalpipettenspitzen bei der Entnahme.

### **3.2.3 Blutentnahmen**

Bei den betreffenden Patienten wurde das Blut sofort nach Stauschlauchanlage am Oberarm aus einer Unterarm- oder Ellenbogenvene (V. cephalica oder V. basilica) entnommen. Es wurde auf ein vollständiges Einziehen der Desinfektionslösung und auf eine kurze Stauung geachtet, um eine Hämolyse zu verhindern. Verwendet wurde dafür eine Butterflynadel-Venofix® (Firma Braun, Lumen 0,8 mm, Nadellänge 20 mm) - mit Adapter und ein Citratröhrchen (Sarstedt Monovette, coagulation 9NC/3 ml) zur Verhinderung einer frühzeitigen Blutgerinnung. Die Blutproben wurden nach Entnahme ungekühlt ins Labor gebracht. Bis zur Untersuchung wurden die Proben genau 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, da die Thrombozyten zunächst refraktär sind (Han et. al., 1974; Hardeman et. al., 1939; Watts et. al., 1986).

### **3.2.4 Blutprobenpräparation**

Der Empfehlung des Herstellers des Aggregometers (Firma Nobis, Endingen) folgend, wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) verdünnt. Demnach wurden 0,5 ml Vollblutprobe und 0,5 ml NaCl in eine Polystyrolküvette eingebracht und ein Magnetührstäbchen (zum Einmalgebrauch) zum ständigen Verrühren dazugegeben (Lifhitz und De Cresce, 1987). Anschließend wurde die Küvette mit der so präparierten Probe im Aggregometer innerhalb von 10 Minuten auf 37°C erwärmt und dann die Messung vorgenommen.

### 3.2.5 Ablauf einer Messung

Nach dem Einschalten des Aggregometers sowie des dazugehörigen Computers wird das Gerät mit einer mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Küvette bestückt und die Elektrode darin eingetaucht. Zeigt die Temperaturanzeige des Gerätes konstant 37°C kann der Messvorgang beginnen.

Dazu wird eine neue Küvette mit einem Rührstäbchen bestückt und mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,5 ml der Blutprobe gefüllt. Die Küvette wird nun in einer speziellen Vertiefung des Heizblocks 10 Minuten bis auf 37°C erwärmt. Dann wird sie in die Vertiefung am Messplatz umgesteckt und die gereinigte Elektrode wird mit ihren zwei Platindrähten darin eingetaucht. Das silikonisierte Rührstäbchen wird dabei durch einen Magnetrührer kontinuierlich in der Probe gedreht und bewirkt eine immer gleiche Verdünnung der Flüssigkeit. Auf den Platinelektroden lagern sich schon beim ersten Kontakt mit dem Blut Thrombozyten in einer einzelligen Schicht (Monolayer) ab.

Vor der Messung wird zuerst eine Eichung vorgenommen. Zum einen um die Ausbildung des Monolayers abzuwarten, zum anderen um einen eventuellen Temperaturabfall beim Einsetzen der Küvette in die Messvorrichtung auszugleichen. Dabei wird der Schreiber auf die Nullposition der Kurve gesetzt und eventuelle Schwankungen der Impedanz mit einem Kontrollrädchen nachreguliert. Dieses Vorgehen eicht den initialen Stromdurchfluss durch die Elektroden bevor ein aggregationsstimulierendes Agens hinzugefügt wird und eine Veränderungen der Impedanz bewirkt. Anschließend wird das gleiche Vorgehen auf der 50% Linie durchgeführt. Die Eichgerade entspricht dann genau einer Impedanzänderung von 50% bzw. 20 Ohm ( $\Omega$ ).

Die Messung wird mit der Zugabe des entsprechenden Agonisten (ADP, Kollagen) gestartet und maximal über einen Zeitraum von 15 Minuten gemessen. Die jeweilige Substanz bewirkt eine weitere Anlagerung von Thrombozyten an die Elektrodendrähte, so dass sich der Widerstand zwischen beiden ändert. Diese Änderung wird vom Aggregometer über das Computerprogramm Aggrolink© als Kurve gegen die Zeit aufgezeichnet. In Abhängigkeit von früherer Auswertbarkeit wird die Messung schon früher beendet (in der Regel nach 7 Minuten). Nach der Messung wird die Elektrode aus der Küvette gezogen und mit Aqua destillata gründlich gereinigt.

**ADP-Messung:** Zur Beginn der Messung wurde 5 µl der ADP-Stammlösung in die mit NaCl verdünnte Vollblutprobe pipettiert. Dies entspricht einer Endkonzentration in der Probe von 5 µmol/ml. Eine normale Aggregation und ATP-Freisetzung werden in Vollblut bei einer Endkonzentration von 5-20 µmol beobachtet.

Die ADP-Aggregation ist bei physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Thromboxan-unabhängig und wird daher durch Acetylsalicylsäure in vivo nicht beeinflusst (Bretschneider et al., 1994). ADP ist ein Inhaltsstoff der elektronendichten Granula der Thrombozyten und dient der autokrinen Stimulation der Thrombozyten und der Aktivierung weiterer Thrombozyten. Hiermit wird also ein wichtiger Mechanismus zur Selbstaktivierung von Thrombozyten an der Stelle einer Gefäßläsion untersucht.

**Kollagen-Messung:** Zu Messbeginn werden 2 µl Kollagen zur Vollblutprobe hinzugefügt. Dies entspricht einer Endkonzentration 2 µg/ml. Eine normale Aggregation und ATP-Freisetzung werden bei einer Endkonzentration von 2-5 µg/ml beobachtet.

Die Kollagenaggregation ist ein klassisches Modell zur Beurteilung der Wirkungen von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion. Bei einer Gefäßschädigung kommen Thrombozyten in Kontakt mit der freiliegenden extrazellulären Matrix, in der das Kollagen enthalten ist. Dieses Modell untersucht also stark vereinfacht die Thrombozytenfunktion an der Stelle eines Gefäßdefektes.

In der Tabelle 2 sind die für diese Arbeit gemessenen Mittelwerte der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation aufgelistet.

**Tab. 2: Normwerte der Aggregation**

Stimulans	Geschlecht	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Mittelwert gesamt [ $\Omega$ ]	t-Test für die Mittelwertgleichheit
Kollagen	Männlich	41	10,71±4,87	11,14±4,46	p=0,404
	Weiblich	46	11,52±4,09		
ADP	Männlich	40	3,83±3,60	3,53±3,56	p=0,464
	Weiblich	44	3,26±3,55		

### 3.2.6 Auswertung der Kurven

Nach der Messung wurde der Graph der Impedanzentwicklung, der mit AGGRO-LINK erstellt wurde, ausgewertet. Die auszuwertenden Impedanzveränderungen und ihre Bedeutung sind in der Tabelle 3 und den Abbildungen 7-10 dargestellt.

**Tab. 3: Impedanzveränderungen**

Parameter	Bedeutung	Auswertung
<b>t-imp</b>	Zeitraum von Messbeginn (Eichgerade) bis zum Beginn der Impedanzzunahme	Zwischen der Eichgeraden und einer Hilfslinie zum Zeitpunkt der Impedanzzunahme wird dieser Wert an dem Graphen abgelesen.
<b>ampl-imp</b>	Impedanzänderung vom Zeitpunkt der Impedanzzunahme in einem Zeitraum von 6 Minuten	Eine weitere Hilfslinie nach 6 Minuten der Impedanzzunahme legt den eigentlichen Messwert fest. Ausgerechnet wurde dieser nach folgendem Schema: Mit Hilfe eines Lineals wurde die Eichgerade, bei der 50% Impedanzänderung 20 Ohm entsprechen, ausgemessen und die Millimeter der Ohmzahl gleichgesetzt. Die Höhe der Impedanzzunahme wurde ebenfalls in Millimetern ausgemessen und mit Dreisatz in Ohm umgerechnet.
<b>slop-imp</b>	Geschwindigkeit der Impedanzänderung	Die Geschwindigkeit der Impedanzzunahme wurde mit Hilfe des Steigungsdreiecks ausgerechnet, wobei gilt $\Delta Y/\Delta X$ (Amplitude/Zeit).



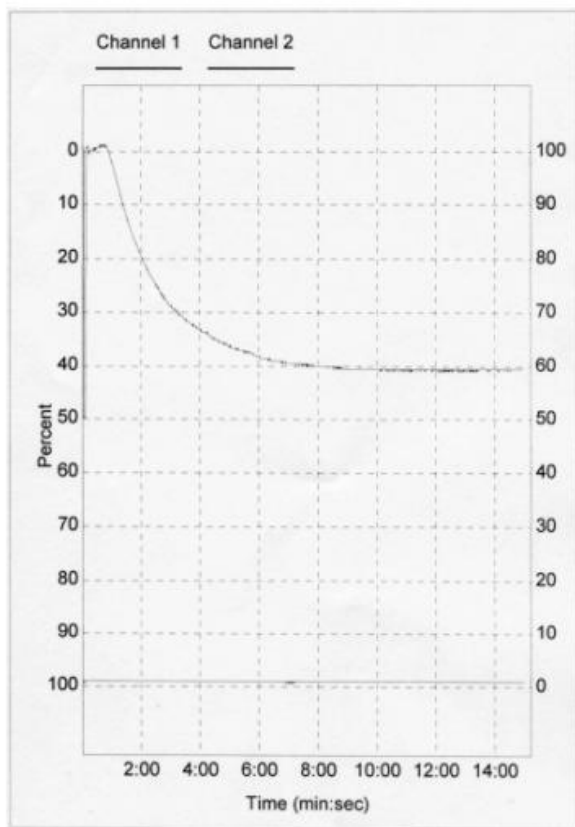


Abb. 7

Die Abb. 7 zeigt die induzierte Thrombozytenaggregation nach Kollagen-Zugabe.

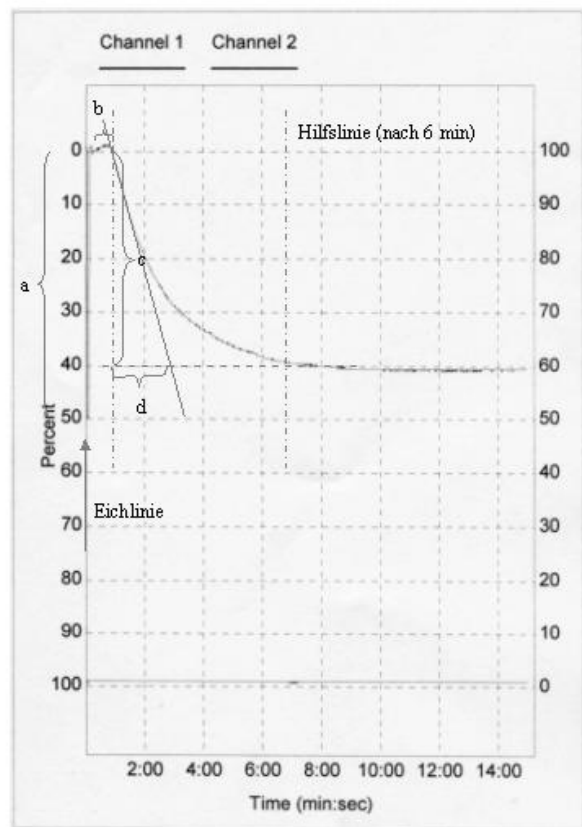


Abb. 8

Die Abb. 8 enthält Hilfslinien zur Berechnung der Werte für  $t\text{-imp}$  [sec]= Zeit bis zum Abfall der Kurve,  $\text{ampl-imp}$  [Ohm]= Höhe der Amplitude der Impedanzveränderung,  $\text{slop-imp}$ = Steigung der Impedanzveränderung.

Beschriftung der Hilfslinien: a= Eichlinie, b= Zeitraum bis zum Abfall der Kurve, c= Wert für die Impedanz (Ohm), d= Zeitraum nach Abfall der Kurve bis Schnittpunkt mit Tangente.

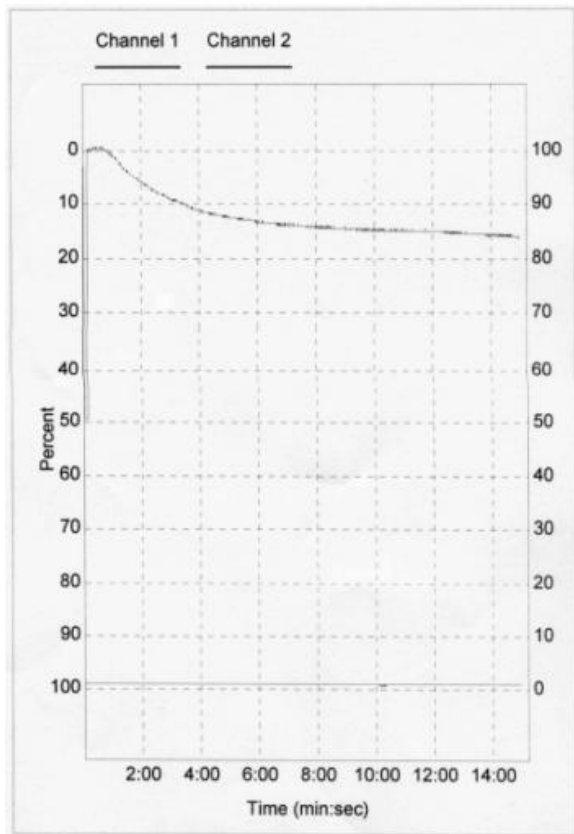
### Beispiel der Berechnung:

**t-imp:** Zeitraum mit b am Graph markiert; b entspricht einem Wert von 3 mm; 19 mm entsprechen 4 min;  $b = 3 \text{ mm} / 19 \text{ mm} \times 4 \text{ min} = 0,63 \text{ min}$

**ampl-imp:** die Eichlinie hat eine Länge von  $a = 43 \text{ mm}$  und das entspricht einer Ohmzahl von  $20 \Omega$ ; damit kann die Ohmzahl von  $c = 34,5 \text{ mm}$  errechnet werden:  $c = 34,5 \text{ mm} / 43 \text{ mm} \times 20 \Omega = 16,04 \Omega$

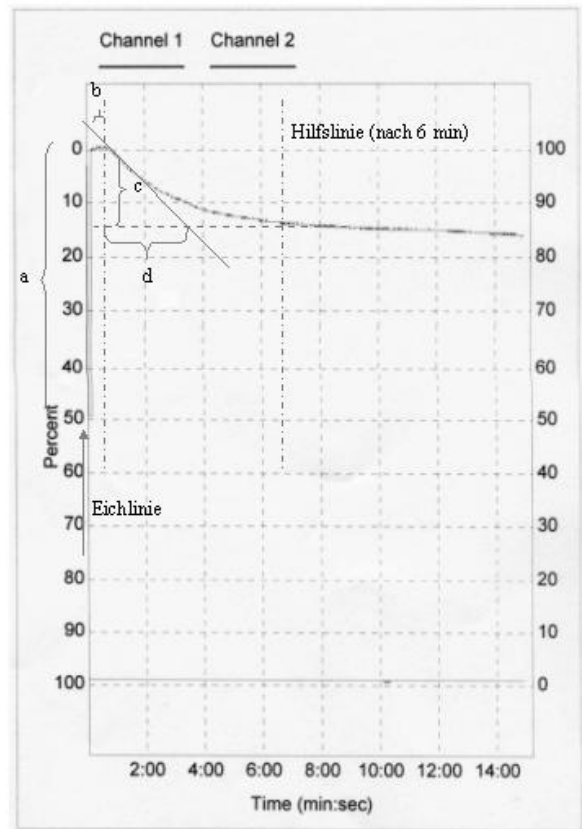
**slop-imp:**  $d = 9 \text{ mm}$  dies entspricht einer Zeit von  $d = 9 \text{ mm} / 19 \text{ mm} \times 4 \text{ min} = 1,89 \text{ min}$ ;  $c = 16,04 \text{ } \Omega$ ; daraus ergibt sich für die Geschwindigkeit der Impedanzzunahme nach dem Steigungsdreieck  $\Delta Y / \Delta X$  folgende Werte:  $\Delta Y = c$  und  $\Delta X = d$ , damit  $c/d = 16,04 \text{ } \Omega / 1,89 \text{ min} = 8,49 \text{ } \Omega/\text{min}$

Zusammenfassung:  $t\text{-imp} = 0,63 \text{ min}$ ;  $\text{ampl-imp} = 16,04 \text{ } \Omega$ ;  $\text{slop-imp} = 8,49 \text{ } \Omega/\text{min}$



**Abb. 9**

Die Abb. 9 zeigt die induzierte Thrombozytenaggregation nach ADP-Zugabe.



**Abb. 10**

Die Abb. 10 enthält Hilfslinien zur Berechnung der Werte für  $t\text{-imp}$  [sec] = Zeit bis zum Abfall der Kurve,  $\text{ampl-imp}$  [Ohm] = Höhe der Amplitude der Impedanzveränderung,  $\text{slop-imp}$  = Steigung der Impedanzveränderung.

Beschriftung der Hilfslinien: a = Eichlinie, b = Zeitraum bis zum Abfall der Kurve, c = Wert für die Impedanz (Ohm), d = Zeitraum nach Abfall der Kurve bis Schnittpunkt mit Tangente.

**Beispiel der Berechnung:**

**t-imp:** Zeitraum mit b am Graph markiert; b entspricht einem Wert von 2,5 mm; 19 mm entsprechen 4 min;  $b = 2,5 \text{ mm} / 19 \text{ mm} \times 4 \text{ min} = 0,53 \text{ min}$

**ampl-imp:** die Eichlinie hat eine Länge von  $a = 42,5 \text{ mm}$  und das entspricht einer Ohmzahl von  $20 \Omega$ ; damit kann die Ohmzahl von  $c = 12 \text{ mm}$  errechnet werden:  $c = 12 \text{ mm} / 42,5 \text{ mm} \times 20 \Omega = 5,65 \Omega$

**slop-imp:**  $d = 12 \text{ mm}$  dies entspricht einer Zeit von  $d = 12 \text{ mm} / 19 \text{ mm} \times 4 \text{ min} = 2,53 \text{ min}$ ;  $c = 5,65 \Omega$ ; daraus ergibt sich für die Geschwindigkeit der Impedanzzunahme nach dem Steigungsdreieck  $\Delta Y / \Delta X$  folgende Werte:  $\Delta Y = c$  und  $\Delta X = d$ , damit  $c/d = 5,65 \Omega / 2,53 \text{ min} = 2,23 \Omega/\text{min}$

**Zusammenfassung:** t-imp = 0,53 min; ampl-imp = 5,65  $\Omega$ ; slop-imp = 2,23  $\Omega/\text{min}$

Für den statistischen Vergleich war lediglich ampl-imp (Impedanzveränderung, Aggregationsstärke) von Bedeutung. Andere Autoren (Mackie et al., 1984; Jones et al., 1985) verwendeten ebenfalls nur die Amplitude der Thrombozytenaggregation zur Bewertung der Blutplättchenfunktion.

**3.2.7 Störfaktoren/Fehlerquellen**

Die häufigste Störquelle während der Messung sind **Injektionsartefakte**. Sie kommen zum Beispiel durch mechanisches Stören der Elektrodenanordnung, Stören der Temperaturkontrolle bei Einspritzen des kalten Agens, Einbringen von Elektrolyten oder Veränderung des Flüssigkeitslevels in der Küvette zustande. Letzteres erzeugt bei korrektem Befüllen der Küvette aber nur minimale Artefakte, die sich schnell ausgleichen.

Um Fehlerquellen beim Benutzen der **Materialien** auszuschließen, wurden diese immer von derselben Firma bestellt und verwendet (siehe 3.2.1 Ausrüstung).

Die **Reagenzien** wurden korrekt nach Herstellerangabe gelagert und vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums verbraucht. Vor Verbrauch und Neubenutzung wurden mehrere Messungen parallel durchgeführt, um eventuelle Unterschiede zu entdecken. War dies der Fall, wurden Ausgleichskoeffizienten für die Werte berechnet.

Die **Blutentnahme** und **Messungen** erfolgten jeweils zur gleichen Tageszeit, um zirkadiane Schwankungen der Aggregation auszuschließen. Weiter wurden die

Blutproben nach Entnahme genau 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und dann anschließend 10 Minuten auf 37 °C aufgewärmt. Hierdurch können zeitabhängige Einflüsse auf die Aggregation ausgeschlossen werden.

### **3.3 In vitro-Messreihe**

Um zu untersuchen, ob der Wirkstoff Valsartan (AT1-Rezeptorantagonist) selbst einen direkten Einfluss auf die Thrombozytenaggregation hat, wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe mit der Rohsubstanz hergestellt. Die Aggregationsmessung im Aggregometer wurde dann wie zuvor beschrieben durchgeführt.

#### **3.3.1 In vitro-Valsartan-Messreihe**

Valsartan ist kein Prodrug und wird nach oraler Gabe rasch resorbiert. Die Bioverfügbarkeit beträgt etwa 25% und die Halbwertszeit liegt bei 6-9 Stunden. Die max. Plasmaspiegelkonzentration von  $1,64 \pm 0,63$  mg/l wird nach 2 Stunden erreicht, wobei eine Plasmakonzentration von 0,23 mg/l reicht, um 50% der Rezeptoraktivität zu blockieren. Die maximale Blockade gegen Angiotensin II am AT1-Rezeptor ist bei einer Konzentration von 1 mg/l erreicht.

Diese pharmakologischen Daten beruhen auf Angaben der Fa. Norvatis Pharma AG. Für die Durchführung der Messreihen wurden drei verschiedene Stammlösungen hergestellt. Die Rohsubstanz Valsartan wurde uns hierzu freundlicherweise von der Firma Norvatis Pharma AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

Um die jeweilige Stammlösung herzustellen, wurde eine entsprechende Menge Substrat (siehe Tabelle 4) in 0,1 N KOH aufgelöst, mit destilliertem Wasser auf das jeweilige Volumen aufgefüllt und anschließend mit HCL auf einen pH-Wert von 8 titriert. Die Messreihe bestand aus 4 Proben. Probe 1 diente hier als Normalwert ohne Zusatz der Stammlösung. Probe 2 und 3 simulieren die Plasmakonzentration bei 50%iger und maximaler Blockade von Angiotensin II am AT1-Rezeptor. Probe 4 simuliert eine unphysiologische Plasmakonzentration die etwa 60mal höher ist als die durch therapeutische Dosen max. erreichte Plasmakonzentration bzw. 100mal höher als die Konzentration, die ausreicht um eine max. Blockade der Rezeptoren zu erreichen. Die Tabelle 4 dokumentiert die Valsartan-Messreihe.

Tab. 4: Valsartan- Messreihe

	Stammlösung	= Plasmakonzentration (mg/l)
Leerprobe		ohne Zusatz von Valsartan
Probe 2	2,3 mg/5l = 0,00046 mg/ml	0,23 mg/l
Probe 3	2 mg/l = 0,002 mg/ml	1 mg/l
Probe 4	10 mg/50ml = 0,2 mg/ml	100 mg/l

Bei der Blutprobenpräparation für die Aggregationsmessung wurde dann 0,5 ml der Stammlösung zu 0,5 ml Vollblut pipettiert und nach 30 Minuten Inkubation ausgewertet.

### 3.4 Statistische Analyse

#### 3.4.1 Auswertung der Daten

Durchgeführt wurden die statistischen Analysen mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0. Für metrische Variablen wurden Mittelwertbestimmungen sowie Mittelwertvergleiche durchgeführt. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für mehrere unverbundene Stichproben erfolgte mittels ANOVA-Test und einer Post-hoc-Analyse nach Bonferroni. Die univariate Analyse wurde genutzt, um den Einfluss von unabhängigen Variablen mit diskreten Werten (Faktoren) und mit metrischen Werten (Kovariate) mitzuberücksichtigen. Um die Art des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen aufzudecken, wurde die Korrelationsanalyse durchgeführt. Fiel diese signifikant aus, wurden diese Variablen mit in die univariate Analyse einbezogen. Als Maß für die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wurde für metrische und normalverteilte Variablen die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson verwendet. Werte  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

#### 3.4.2 Graphische Darstellung der Ergebnisse

##### 3.4.2.1 Box-Whisker-Plots

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die Box-Whisker-Plots verwendet. Ausgangspunkt dieser Darstellung bildet eine Box, deren untere und obere Begrenzungslinien durch das untere und obere Quartil (Q) der Messergebnisse festgelegt sind. Innerhalb der Box wird der Median durch eine horizontale Linie markiert.

Die Whiskers (vertikale Linienstücke) werden unterhalb bzw. oberhalb der Box abgetragen. Die Linienendpunkte sind durch den größten und kleinsten Messwert definiert. Wenn allerdings diese Werte vom oberen bzw. unteren Rand der Box zu weit entfernt liegen (mehr als 1.5 ( $Q3-Q1$ )), endet die Linie bei dem höchsten bzw. niedrigsten Messwert, der gerade noch innerhalb dieses Bereiches liegen. Alle Messwerte die extremer sind, werden einzeln dargestellt (oval).

#### 3.4.2.2 95% Konfidenzintervall

Es wird ein Intervall angegeben, welches mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit  $1-\alpha$  den zu schätzenden wahren Parameter der Verteilung in der Grundgesamtheit überdeckt. In der vorliegenden Arbeit wurde  $1-\alpha=0.95$  gesetzt, also  $\alpha=0,05$ . Dabei gibt  $\alpha$  die Irrtumswahrscheinlichkeit an, dass der gewählte Bereich den Parameter nicht überdeckt.

#### 3.4.2.3 Korrelationskoeffizient

Der Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson ist ein quantitatives Maß für die Beziehung zwischen zwei stetigen Merkmalen und beschreibt die lineare Komponente des Zusammenhangs. Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen und ist eine einheitslose Größe.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Erhebung eines Normalkollektives/Vergleichskollektives

Ziel dieser Studie ist die Bestimmung der Plättchenaggregation von Patienten, die keine Medikamente einnehmen oder aber Medikamente nehmen, die signifikant keinen Einfluss auf die Plättchenaggregation haben. Dieses erhobene Kollektiv dient als Vergleichskollektiv für die Untersuchungen 4.2 bis 4.11.

Hierzu wurden der Einfluss von bestimmten Laborwerten, Alter und Geschlecht, sowie der Einfluss bestimmter Medikamente auf die Plättchenaggregation untersucht. Weiter wurde ein Vergleich der Plättchenaggregation in Vene und Arterie durchgeführt. Es wurde die Plättchenaggregation von Patienten gemessen, die folgende Ausschlusskriterien erfüllten:

- Keine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten
- Kein Diabetes mellitus und keine Depression
- Kein Nikotinkonsum

#### 4.1.1 Untersuchung der Plättchenaggregation in Abhängigkeit von speziellen Laborparametern, Alter und Geschlecht des Patienten

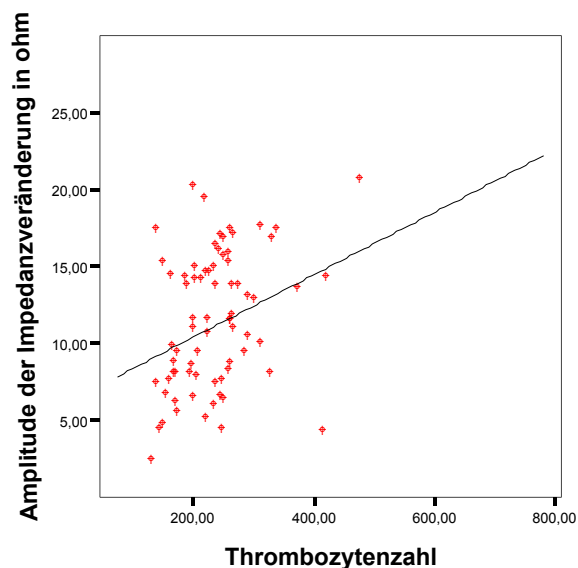
##### 4.1.1.1 Korrelationsanalyse der Laborparameter

Es wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Amplitude der Impedanzmessung (ampl-imp) und den folgenden Laborwerten besteht. Hierzu wurde für die Werte ampl-imp, CRP, Quick, PTT, INR, HDL, LDL, Triglyceride, Cholesterin, Thrombozytenzahl und Kreatinin eine bivariate Korrelationsanalyse mit zweiseitiger Testung auf Signifikanz durchgeführt. In den folgenden Tabellen 5 und 6 sind die p-Werte für die Signifikanz und der Korrelationskoeffizient  $r$  (siehe 3.4.2.3) nach Pearson aufgeführt. Konnte eine Korrelation gefunden werden, wurde diese mit einem Streudiagramm graphisch dargestellt.

**Tab. 5: Korrelationsanalyse zwischen ampl-imp und den Laborwerten für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation** (mit \* gekennzeichnete Wert ist signifikant ( $p < 0,05$ ))

Laborwerte	Korrelationskoeffizient nach Pearson	Signifikanz
CRP	$r = -0,13$	$p = 0,32$
PTT	$r = -0,13$	$p = 0,27$
Quick	$r = 0,03$	$p = 0,78$
INR	$r = -0,03$	$p = 0,8$
Thrombozytenzahl	$r = 0,3$	$p = 0,01^*$
Kreatinin	$r = -0,03$	$p = 0,78$
LDL	$r = 0,02$	$p = 0,88$
HDL	$r = -0,03$	$p = 0,81$
Cholesterin	$r = 0,08$	$p = 0,54$
Triglyceride	$r = -0,07$	$p = 0,59$

Für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation konnte eine signifikante ( $p = 0,01$ ) Korrelation zwischen ampl-imp und der Thrombozytenzahl gezeigt werden. In der Abb. 11 wird diese Korrelation mit der Regressionsgeraden dargestellt.



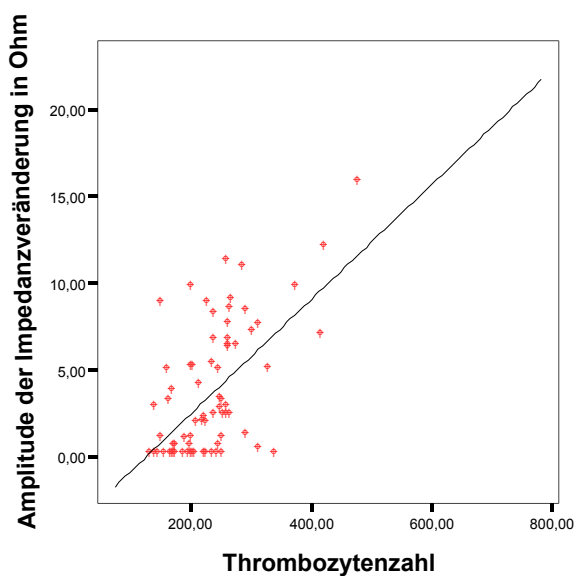
**Abb. 11: Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl ( $\cdot 10^9/l$ ) und Amplitude der Impedanz (Ohm) für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**



**Tab. 6: Korrelationsanalyse zwischen ampl-imp und den Laborwerten für die ADP-induzierte Plättchenaggregation** (mit \* gekennzeichnete Wert ist signifikant ( $p < 0,05$ ))

Laborwerte	Korrelationskoeffizient nach Pearson	Signifikanz
CRP	$r=0,13$	$p=0,31$
PTT	$r=0,15$	$p=0,19$
Quick	$r=-0,2$	$p=0,08$
INR	$r=0,22$	$p=0,07$
Thrombozytenzahl	$r=0,59$	$p \leq 0,001^*$
Kreatinin	$r=0,1$	$p=0,41$
LDL	$r=-0,11$	$p=0,40$
HDL	$r=-0,20$	$p=0,12$
Cholesterin	$r=-0,1$	$p=0,46$
Triglyceride	$r=0,03$	$p=0,85$

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen ampl-imp und der Thrombozytenzahl ( $p \leq 0,001$ ). In der Abb. 12 wird diese Korrelation mit der Regressiongeraden dargestellt.



**Abb. 12: Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl ( $\cdot 10^9/l$ ) und Amplitude der Impedanz (Ohm) für die ADP-induzierte Plättchenaggregation**

#### 4.1.1.2 Korrelationsanalyse zwischen ampl-imp und dem Alter der Patienten

Hierzu wurde für die Werte ampl-imp und Alter eine bivariate Korrelationsanalyse mit zweiseitiger Testung auf Signifikanz durchgeführt.

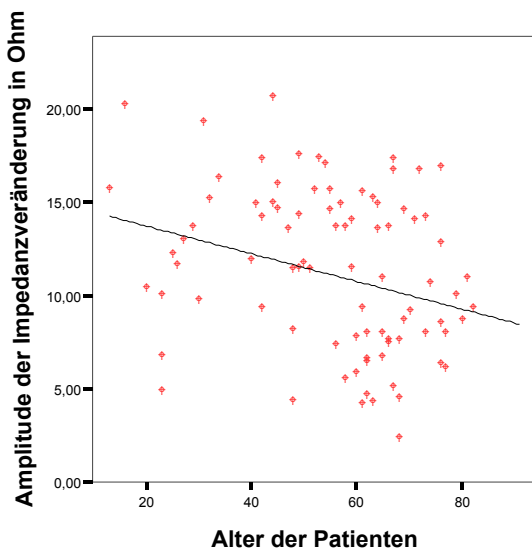
**Tab. 7: Korrelationsanalyse zwischen ampl-imp und den Laborwerten für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Merkmal	Korrelationskoeffizient nach Pearson	Signifikanz
Alter	$r=-0,281$	$p=0,008$

**Tab. 8: Korrelationsanalyse zwischen ampl-imp und den Laborwerten für die ADP-induzierte Plättchenaggregation**

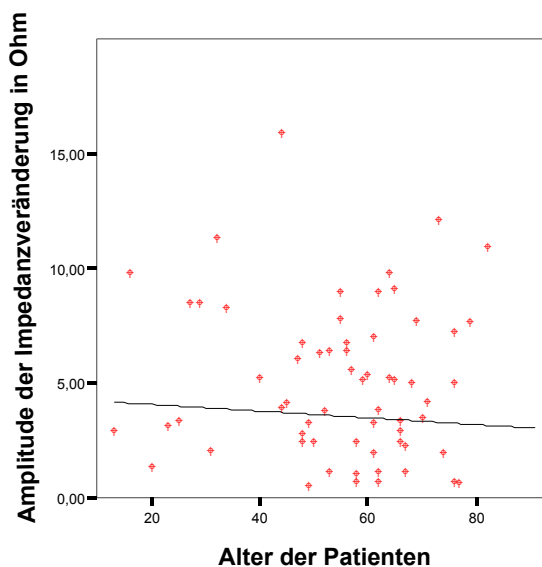
Merkmal	Korrelationskoeffizient nach Pearson	Signifikanz
Alter	$r=-0,069$	$p=0,530$

Es konnte für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation eine signifikante Korrelation zwischen Alter des Patienten und Amplitude der Impedanz nachgewiesen werden. Die Abb. 13 und 14 veranschaulichen das Ergebnis.



**Abb. 13**

Die Abb. 13 zeigt die Korrelation zwischen Alter der Patienten und Amplitude der Impedanzveränderung nach Kollagen-induzierter Plättchenaggregation.



**Abb. 14**

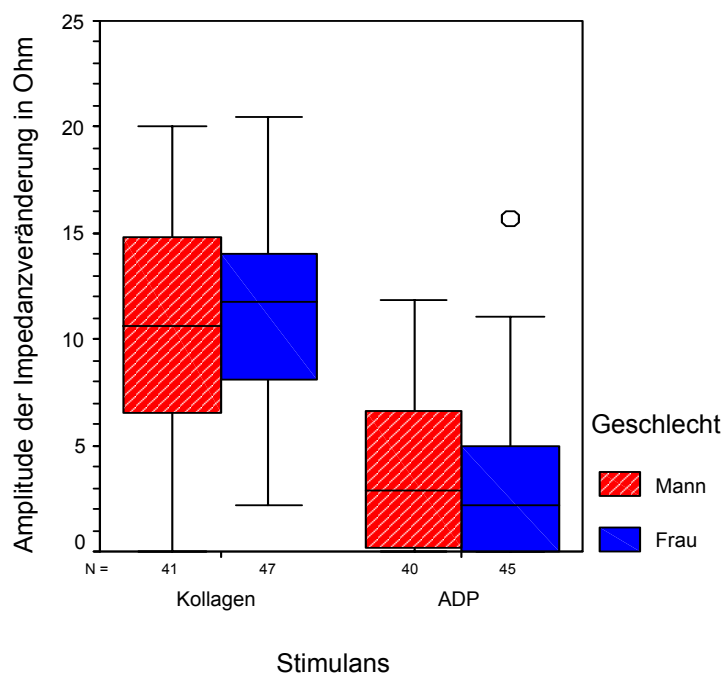
Die Abb. 14 zeigt die Korrelation zwischen Alter der Patienten und Amplitude der Impedanzveränderung nach ADP-induzierter Plättchenaggregation.

#### 4.1.1.3 Es wurde die Abhängigkeit der Plättchenaggregation vom Geschlecht der Patienten untersucht

Es zeigten sich im t-Test für unabhängige Stichproben sowohl für die Kollagen, als auch für die ADP-induzierte Plättchenaggregation keine signifikanten Unterschiede.

**Tab. 9: Übersicht der Werte für die Plättchenaggregation in Abhängigkeit vom Geschlecht**

Stimulans	Geschlecht	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Mittelwert gesamt [ $\Omega$ ]	t-Test für die Mittelwertgleichheit
Kollagen	Männlich	41	10,71 $\pm$ 4,87	11,14 $\pm$ 4,46	p=0,404
	Weiblich	46	11,52 $\pm$ 4,09		
ADP	Männlich	40	3,83 $\pm$ 3,60	3,53 $\pm$ 3,56	p=0,464
	Weiblich	44	3,26 $\pm$ 3,55		



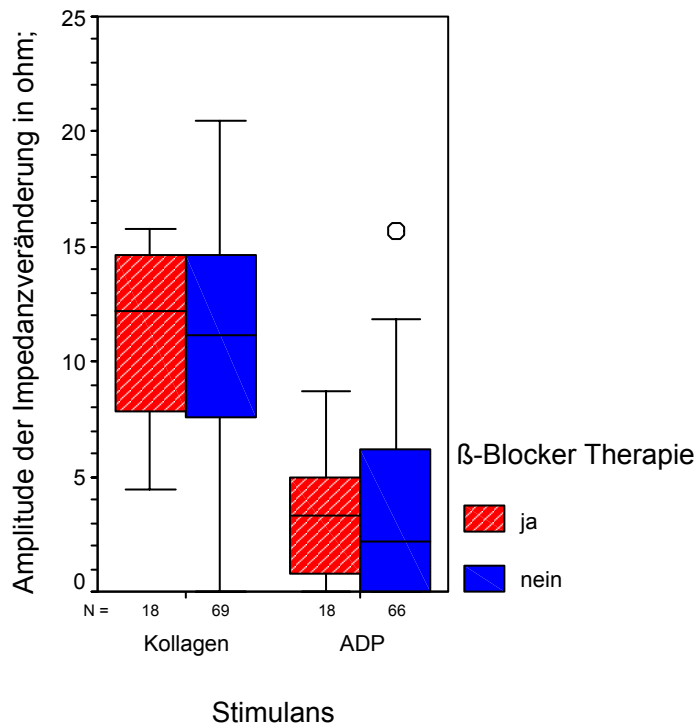
**Abb. 15: Vergleich der Amplitude der Impedanzänderung von Mann und Frau**

#### 4.1.2 **Untersuchung der Plättchenaggregation in Abhängigkeit von der Medikation**

Es wurde der Einfluss der Medikamente  $\beta$ -Blocker,  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten, Nitrate, CSE-Hemmer, Digitalis, Diuretika, Phenprocoumon und Heparin auf die Plättchenaggregation untersucht.

#### 4.1.2.1 Therapie mit $\beta$ -Blockern

Es wurde der Einfluss der Therapie mit  $\beta$ -Blockern auf die Plättchenaggregation untersucht.



**Abb. 16: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne  $\beta$ -Blocker Therapie**

**Tab. 10: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

$\beta$ -Blocker	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	18	11,54	12,18	3,67	0,86	p=0,675
nein	69	11,04	11,18	4,67	0,56	
insgesamt	87	11,14				

**Tab. 11: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

$\beta$ -Blocker	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	18	3,46	3,31	2,79	0,66	p=0,928
nein	66	3,55	2,22	3,77	0,46	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben wurde kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne  $\beta$ -Blocker gefunden.

#### 4.1.2.2 Therapie mit Nitraten

Es wurde der Einfluss der Therapie mit Nitraten auf die Plättchenaggregation untersucht.

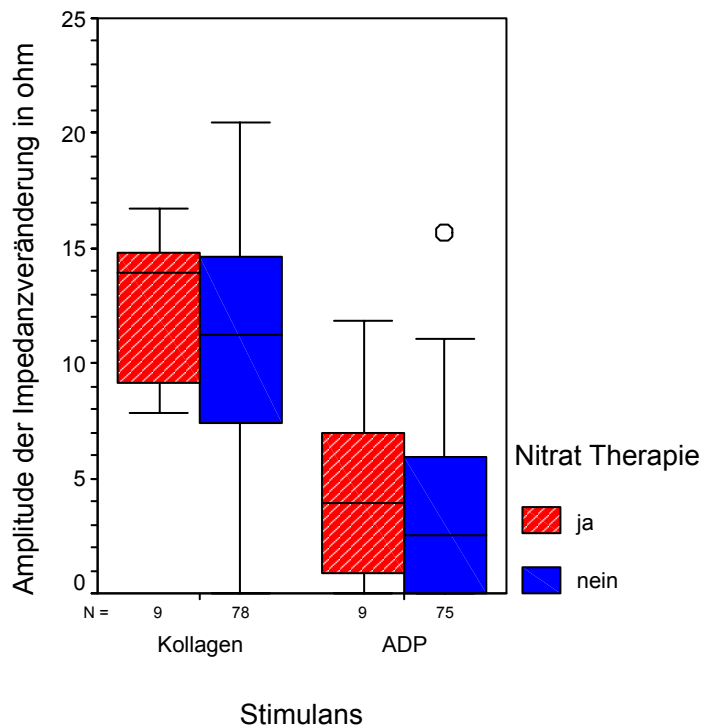


Abb. 17: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne Nitrate Therapie

Tab. 12: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

Nitrate	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	9	12,43	13,91	3,33	1,11	p=0,361
nein	78	10,99	11,26	4,57	0,52	
insgesamt	87	11,14				

Tab. 13: ADP-induzierte Plättchenaggregation

Nitrate	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	9	4,75	3,91	4,37	1,46	p=0,282
nein	75	3,39	2,55	3,46	0,4	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne Nitrate gefunden werden.

#### 4.1.2.3 Therapie mit CSE-Hemmern

Es wurde der Einfluss der Therapie mit CSE-Hemmern auf die Plättchenaggregation untersucht.

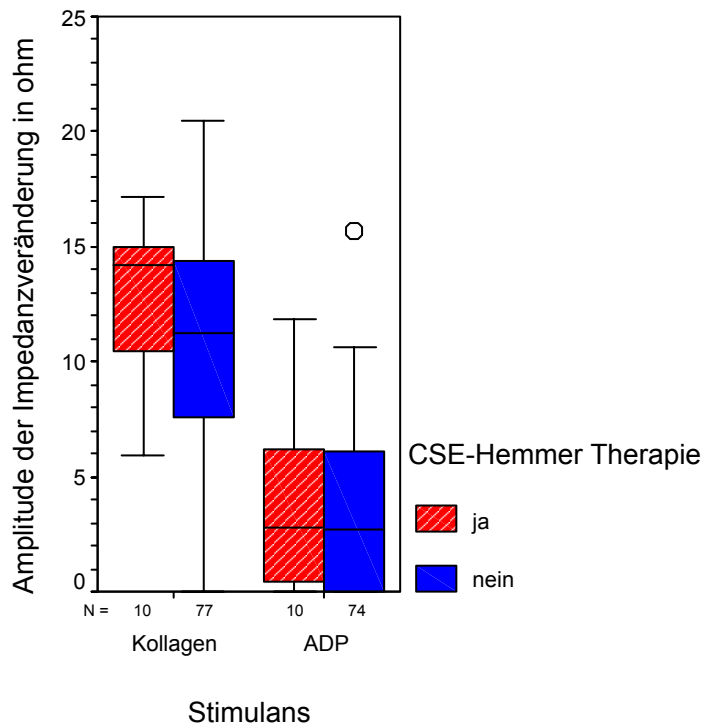


Abb. 18: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne CSE-Hemmer Therapie

Tab. 14: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

CSE-Hemmer	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	10	12,72	14,24	4,03	1,27	p=0,236
nein	77	10,93	11,21	4,50	0,51	
insgesamt	87	11,14				

Tab. 15: ADP-induzierte Plättchenaggregation

CSE-Hemmer	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	10	4,11	2,82	4,44	1,4	p=0,589
nein	74	3,45	2,67	3,46	0,40	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne CSE-Hemmer.

#### 4.1.2.4 Therapie mit $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten

Es wurde der Einfluss der Therapie mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten auf die Plättchenaggregation untersucht.

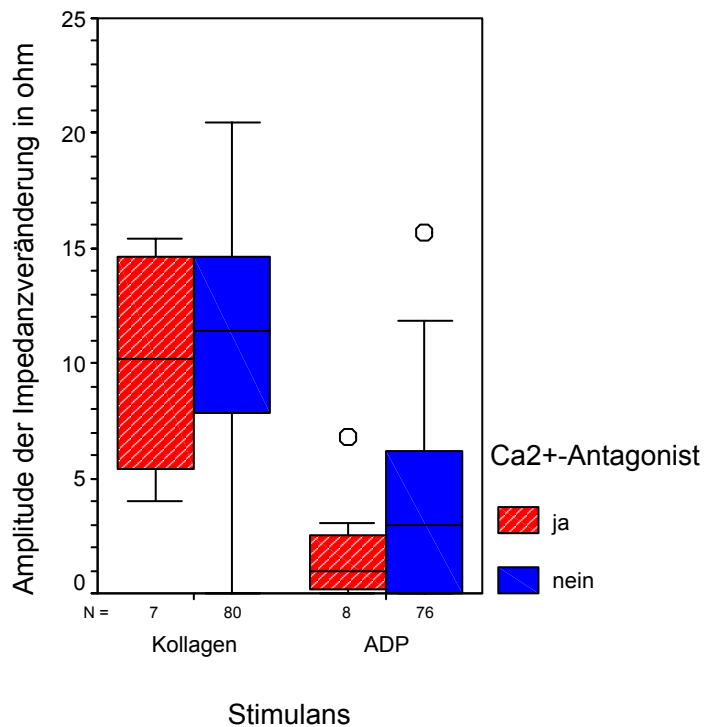


Abb. 19: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten Therapie

Tab. 16: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten	N	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	7	9,96	10,22	5,03	1,90	p=0,470
nein	80	11,24	1,40	4,43	0,5	
insgesamt	87	11,14				

Tab. 17: ADP-induzierte Plättchenaggregation

Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten	N	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	8	1,78	0,99	2,28	0,8	p=0,145
nein	76	3,72	2,97	3,63	0,42	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonist.

#### 4.1.2.5 Therapie mit Digitalis

Es wurde der Einfluss der Therapie mit Digitalis auf die Plättchenaggregation untersucht.

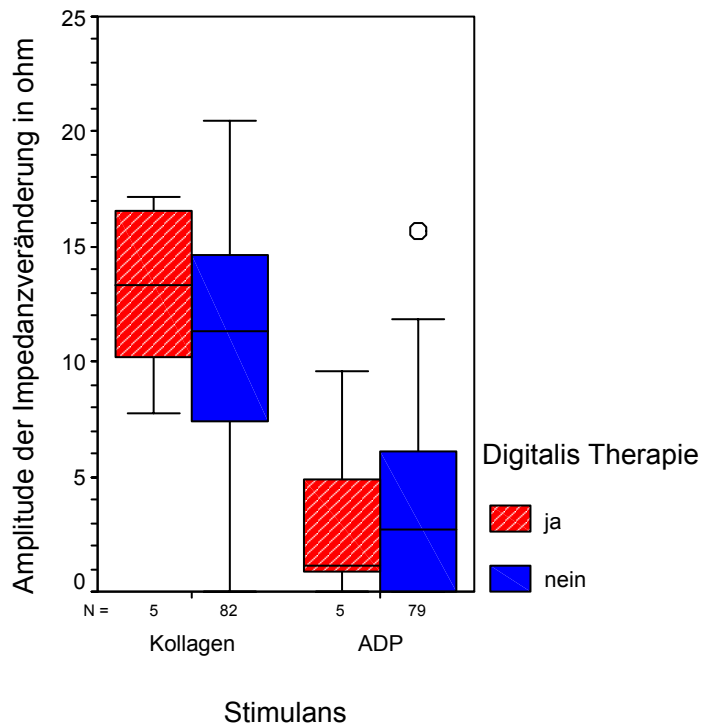


Abb. 20: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne Digitalis Therapie

Tab. 18: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

Digitalis	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	5	13,00	13,33	4,02	1,8	p=0,341
nein	82	11,03	11,31	4,49	0,5	
insgesamt	87	11,14				

Tab. 19: ADP-induzierte Plättchenaggregation

Digitalis	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	5	3,28	1,09	3,98	1,78	p=0,874
nein	79	3,55	2,67	3,56	0,40	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne Digitalis gefunden werden.



#### 4.1.2.6 Therapie mit Diuretika

Es wurde der Einfluss der Therapie mit Diuretika auf die Plättchenaggregation untersucht.

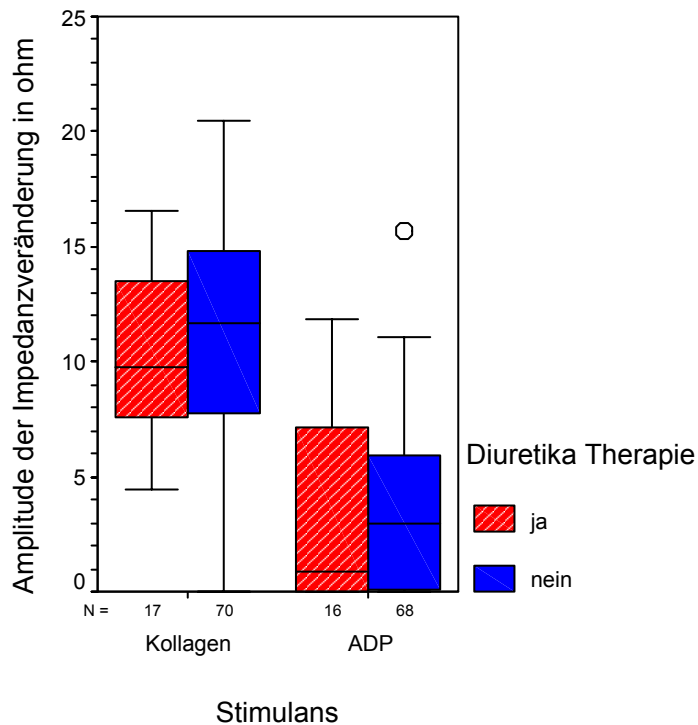


Abb. 21: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne Diuretika Therapie

Tab. 20: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

Diuretika	N	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	17	10,14	9,78	3,62	0,88	p=0,307
nein	70	11,38	11,65	4,64	0,55	
insgesamt	87	11,14				

Tab. 21: ADP-induzierte Plättchenaggregation

Diuretika	N	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	16	3,32	0,88	4,06	1,02	p=0,794
nein	68	3,58	2,97	3,47	0,42	
insgesamt	84	3,43				

Im t-Test für unabhängige Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne Diuretika gefunden werden.

#### 4.1.2.7 Therapie mit Phenprocoumon

Es wurde der Einfluss der Therapie mit Phenprocoumon (Marcumar®) auf die Plättchenaggregation untersucht.

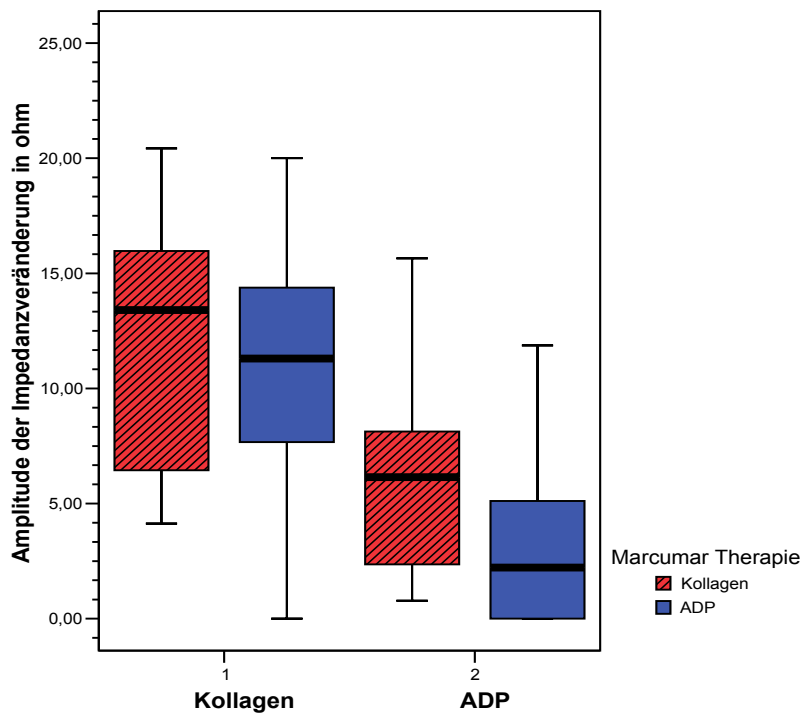


Abb. 22: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne Phenprocoumon Therapie

Tab. 22: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

Phenprocoumon	N	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	12	11,97	13,41	5,45	1,57	p=0,223
nein	75	11,01	11,30	4,31	0,50	
insgesamt	87	11,14				

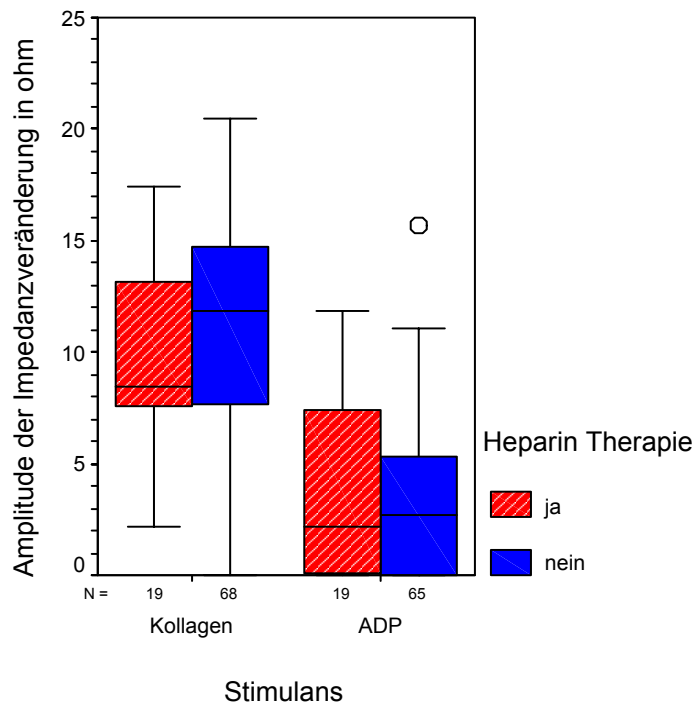
Tab. 23: ADP-induzierte Plättchenaggregation

Phenprocoumon	N	Mittelwert [Ω]	Median[Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	11	6,06	6,15	4,32	1,30	p=0,441
nein	73	3,15	2,22	3,30	0,38	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne Phenprocoumon gefunden werden.

#### 4.1.2.8 Therapie mit Heparin

Es wurde der Einfluss der Therapie mit fraktioniertem oder unfractioniertem Heparin auf die Plättchenaggregation untersucht.



**Abb. 23: Messung der Plättchenaggregation von Patienten mit oder ohne Heparin Therapie**

**Tab. 24: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Heparin	N	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	19	9,75	8,48	4,10	0,94	p=0,126
nein	68	11,53	11,87	4,51	0,55	
insgesamt	87	11,14				

**Tab. 25: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Heparin	N	Mittelwert [Ω]	Median[Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standardfehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	19	3,79	2,17	4,09	0,94	p=0,723
nein	65	3,46	2,67	3,42	0,42	
insgesamt	84	3,53				

Im t-Test für unabhängige Stichproben konnte kein signifikanter Unterschied für die Plättchenaggregation zwischen der Therapie mit und ohne Heparin gefunden werden.

#### 4.1.2.9 Übersicht der Medikation und der Laborparameter des Kontrollkollektives

**Tab. 26: Übersicht der Medikation** (in Klammern stehen die prozentualen Werte in Bezug zur Gesamtzahl der Patienten)

Merkmal	Stimulans	
	Kollagen	ADP
Anzahl der Patienten	87	84
Alter (Jahre)	55,06±16,81	55,10±16,68
Geschlecht    Mann Frau	41 (47)	40 (48)
	46 (53)	44 (52)
β-Blocker	18 (21)	18 (21)
Nitrate	9 (10)	9 (11)
CSE-Hemmer	10 (11)	10 (12)
Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten	7 (8)	8 (10)
Digitalis	5 (6)	5 (6)
Diuretika	17 (20)	16 (19)
Phenprocoumon	12 (14)	11 (13)
Heparin	19 (22)	19 (23)

**Tab. 27: Übersicht der Laborwerte**

Laborwert	Stimulans	
	Kollagen	ADP
CRP (mg/l)	2,03±2,88	2,05±2,89
PTT (sec)	35,59±21,06	35,66±21,33
Quick (%)	87,60±29,74	87,79±29,20
INR	1,24±0,52	1,25±0,52
Thrombozytenzahl (1000/μl)	235,04±66,48	233,35±66,39
Kreatinin (mg/dl)	1,02±0,50	1,03±0,50
LDL (mg/dl)	130,35±41,56	138,93±54,30
HDL (mg/dl)	58,42±17,47	57,73±16,85
Cholesterin (mg/dl)	213,09±47,02	212,66±47,70
Triglyceride (mg/dl)	123,24±58,72	124,2±59,26

#### 4.1.2.10 Univariate multifaktorielle Varianzanalyse für die Medikation

Die Analyse im Allgemeinen linearen Modell zeigte für die univariate multifaktorielle Varianzanalyse für die Medikamente  $\beta$ -Blocker,  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten, Nitrate, CSE-Hemmer, Digitalis, Diuretika, Phenprocoumon und Heparin in der Hauptwirkung und im 2-seitigen Weg keine signifikanten Werte.

#### 4.1.3 Vergleich der Plättchenaggregation in Vene und Arterie

Venöses und arterielles Blut unterscheiden sich im pH-Wert und Sauerstoffgehalt. Um eine Abhängigkeit der Amplitude der Impedanzmessung vom pH-Wert und Sauerstoffgehalt auszuschließen, wurde bei 19 Patienten mit einem PFO (persistierendes Foramen ovale) zu Beginn einer Rechts- und Linkskatheter-Untersuchung und vor Medikamentengabe venöses Blut aus der Vena femoralis, Vena cava, rechtes Atrium und arterielles Blut aus der Arteria femoralis und dem linken Ventrikel entnommen. In der Tabelle 28 sind die Werte für Plättchenaggregation in venösem und arteriellem Blut zusammengefasst.

**Tab. 28: Plättchenaggregation in venösem und arteriellem Blut**

Stimulation mit	Blut	Anzahl der Patienten	Mittelwert der Aggregation [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	t-Test für die Mittelwertgleichheit
Kollagen	venös	19	11,34	5,56	p=0,926
	arteriell	19	11,55	5,25	
ADP	venös	18	4,14	3,53	p=0,633
	arteriell	18	4,74	3,85	

Es konnte kein signifikanter Unterschied für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation zwischen venösem und arteriellem Blut nachgewiesen werden.

## **4.2 Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation**

### **4.2.1.1 Untersuchung der Risikofaktoren Diabetes mellitus und Depression**

Es wurde der Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus und Depression auf die Plättchenaggregation untersucht. Hierzu wurde das unter 4.1 ermittelte Kollektiv als Kontrolle verwendet und mit den beiden Kollektiven Diabetes mellitus und Depression verglichen. In das Diabetes-Kollektiv wurde Patienten mit einem bekannten Diabetes mellitus Typ I oder II aufgenommen. Es wurde nicht zwischen den einzelnen Medikamentengruppen, den einzelnen HbA1c-Werten, dem Alter und Geschlecht unterschieden. Das „Depressions-Kollektiv“ setzt sich aus Patienten zusammen, bei denen nach fachpsychiatrischer Untersuchung eine Depression diagnostiziert wurde. Die Blutentnahme erfolgt vor der Einstellung mit Antidepressiva. Zur Evaluierung der Beeinflussung der Plättchenaggregation durch Diabetes mellitus und Depression wurden jeweils Studienprotokolle in der Arbeitsgruppe Prof. Bauriedel konzipiert, die von der Ethikkommission unserer Fakultät geprüft und genehmigt wurden. Für die in die einzelnen Untersuchungsgruppen eingeschlossenen Patienten gelten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten
- Kein Nikotinkonsum

In den Tabellen 29 und 30 sind die gemessenen Werte für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation aufgeführt. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für die drei unverbundenen Stichproben erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA-Prozedur mit einer Post-hoc-Analyse nach Bonferroni.

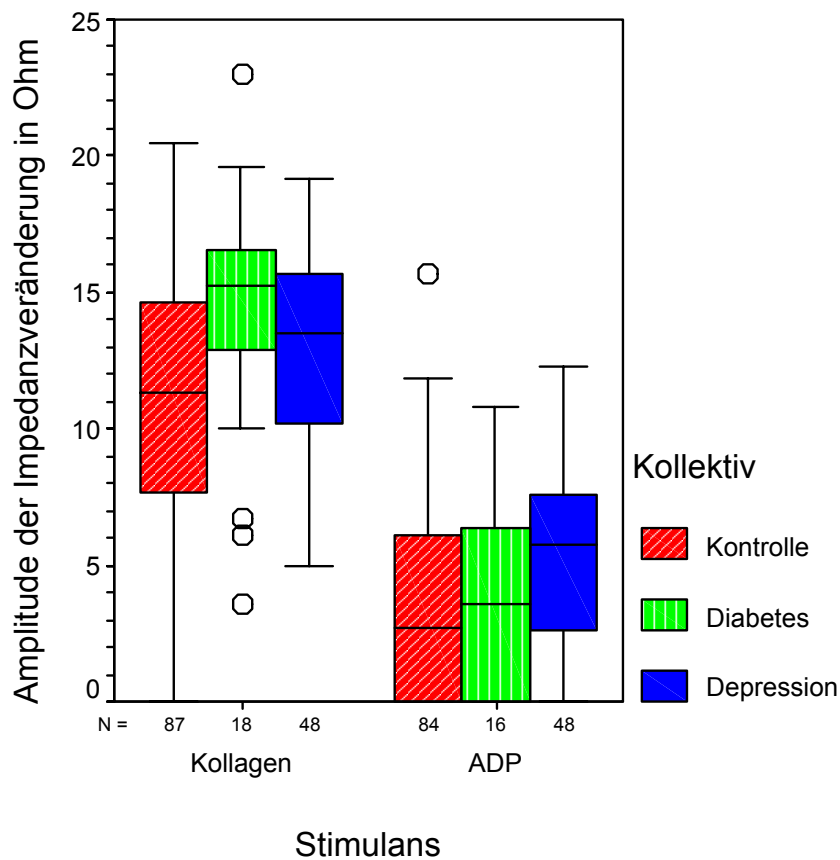
**Tab. 29: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

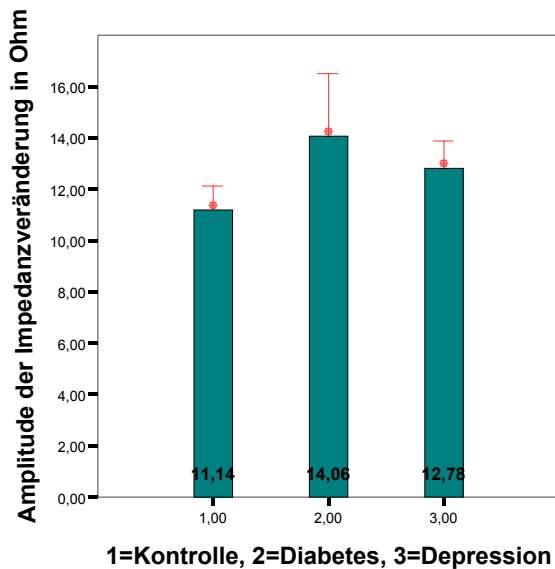
Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	
Diabetes	18	62,67±13,82	14,06	15,25	4,83	1,14	p=0,028*
Depression	48	43,35±10,91	12,78	13,48	3,69	0,53	p=0,105

**Tab. 30: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

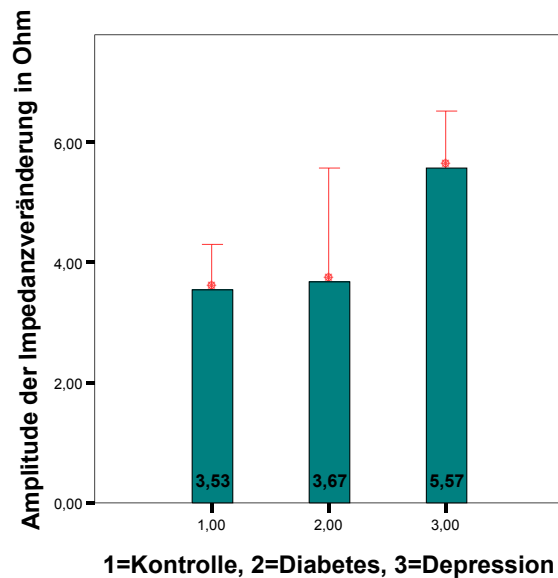
Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	
Diabetes	16	62,50±14,54	3,67	3,56	3,55	0,89	p=1,000
Depression	48	43,35±10,91	5,57	5,74	3,23	0,47	p=0,004*

Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation des Diabetes-Kollektivs (26%, p=0,028), sowie eine signifikante Erhöhung der ADP-induzierten Plättchenaggregation für das „Depressions-Kollektiv“ (58%, p=0,004) im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv. Die Abb. 24-26 veranschaulicht die Messergebnisse.

**Abb. 24: Darstellung der Plättchenaggregation nach Kollagen- und ADP-induzierter Plättchenaggregation**

**Abb. 25**

Die Abb. 25 zeigt als Balkendiagramm mit den 95% Konfidenzintervallen der Mittelwerte den Vergleich der Kollektive für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation.

**Abb. 26**

Die Abb. 26 zeigt als Balkendiagramm mit den 95% Konfidenzintervallen der Mittelwerte den Vergleich der Kollektive für die ADP-induzierte Plättchenaggregation.

#### 4.2.1.2 Untersuchung des Risikofaktors Nikotinkonsum

Es wurde der Einfluss des Nikotinkonsums auf die Plättchenaggregation untersucht. Die in diese Studie aufgenommenen Patienten erfüllten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten
- Kein Diabetes mellitus und keine Depression
- Nikotinkonsum

In den Tabellen 31 und 32 sind die Ergebnisse für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation aufgeführt.



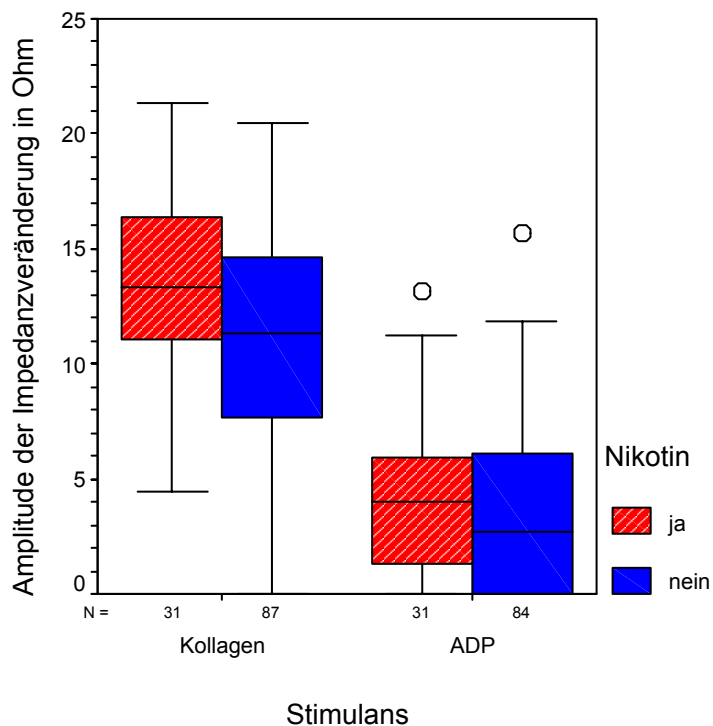
**Tab. 31: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Nikotinkonsum	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	31	52,58±18,85	13,72	13,33	4,23	0,76	p=0,006*
nein	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	

**Tab. 32: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Nikotinkonsum	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
ja	31	51,94±18,64	4,39	4,00	3,51	0,63	p=0,250
nein	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	

Im t-Test für unabhängige Stichproben konnte eine signifikant ( $p=0,006$ ) erhöhte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation für das Patientenkollektiv mit Nikotinkonsum gezeigt werden. Dies bedeutet eine um 23% erhöhte Plättchenaggregation gegenüber dem Kollektiv ohne Nikotinkonsum. Die Abb. 27 veranschaulicht die Messergebnisse.

**Abb. 27: Plättchenaggregation von Patienten mit und ohne Nikotinkonsum**

**Tab. 33: Patientencharakteristika und Medikation der Patienten mit Nikotinkonsum** (in Klammern stehen die prozentualen Werte in Bezug zur Gesamtzahl der Patienten)

Merkmal	Patientenkollektiv mit Nikotinkonsum
Anzahl der Patienten	31
Alter (Jahre)	52,58±18,85
Geschlecht Mann	8 (26)
Frau	23 (74)
β-Blocker	8 (26)
Nitrate	3 (10)
CSE-Hemmer	5 (16)
Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten	4 (13)
Digitalis	5 (16)
Diuretika	6 (19)
Marcumar	1 (3)
Heparin	5 (16)
Cortison	1 (3)
VES	2 (6)
Vorhofflimmern	2 (6)
Hypertonus	10 (32)
Hyperlipidämie	9 (29)
Niereninsuffizienz	1 (3)
Schilddrüsenunterfunktion	7 (23)
Adipositas	4 (13)
Z.n. Infarkt	2 (6)

**Tab. 34: Laborwerte der Patienten mit Nikotinkonsum**

Laborwert	Mittelwert
CRP (mg/dl)	15,38±33,58
PTT (sec)	27,03±4,38
Quick (%)	101,17±27,0
INR	4,44±17,81
Thrombozytenzahl (1000/μl)	234,39±76,83
Kreatinin (mg/dl)	0,83±0,16
LDL (mg/dl)	117,43±35,56
HDL (mg/dl)	62,12±17,55
Cholesterin (mg/dl)	206,17±39,59
Triglyceride (mg/dl)	133±106,01

#### 4.2.1.3 Zusammenfassung der Befunde

Es konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation für Patienten mit Nikotinkonsum (23%,  $p=0,006$ ) und Patienten mit Diabetes mellitus (26%,  $p=0,047$ ) signifikant gegenüber dem Kontrollkollektiv erhöht ist. Weiter konnte eine signifikante Erhöhung der Plättchenaggregation für das Depressions-Kollektiv (58%,  $p=0,004$ ) in der ADP-induzierten Plättchenaggregation gezeigt werden.

### 4.3 Testung der Plättchenaggregation bei Therapie mit etablierten antithrombozytären Substanzen

Es wurde der Einfluss der Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel (Clo) auf die Plättchenaggregation untersucht. Hierzu wurden die Patienten in eine Gruppe ASS und in eine Gruppe Clo mit/ohne ASS aufgeteilt und mit der Plättchenaggregation der Kontroll-Gruppe aus 4.1 verglichen. Für die in diese Studie eingeschlossenen Patienten gelten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten
- Kein Diabetes mellitus, keine Depression, kein Nikotinkonsum

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 35 und 36 aufgeführt. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe der Box-Whisker-Plots in Abb. 28 und der Darstellung des 95% Konfidenzintervalls in Abb. 29.

**Tab. 35: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	
ASS	37	60,00±15,22	6,63	6,22	4,21	0,69	$p=0,000^*$
Clo m./o. ASS	10	62,80±11,57	9,14	9,90	4,44	1,40	$p=0,525$

**Tab. 36: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	
ASS	35	59,94±14,68	2,51	2,17	2,13	0,36	$p=0,321$
Clo m./o. ASS	8	61,63±11,25	0,38	0,00	0,71	0,25	$p=0,022^*$

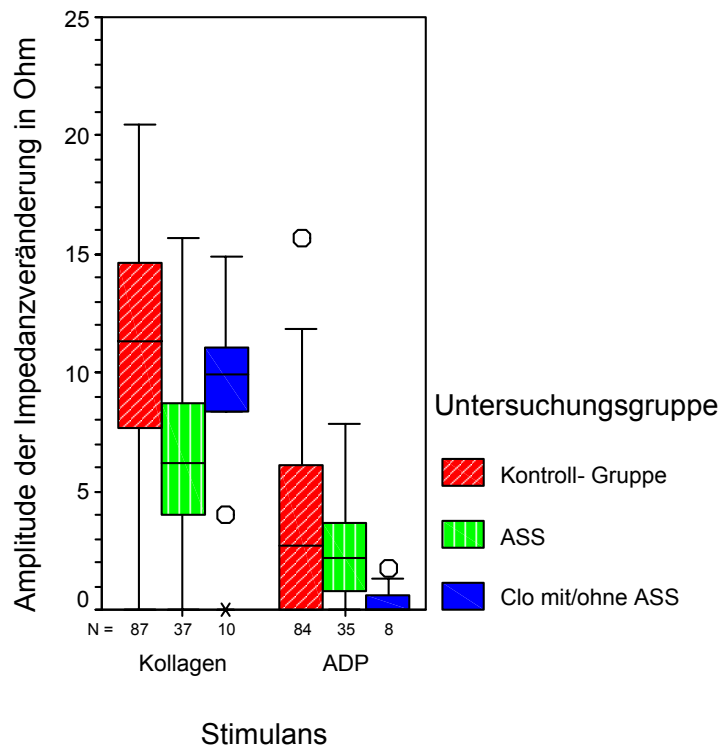


Abb. 28: Darstellung der ampl-imp in Abhängigkeit von der Untersuchungsgruppe

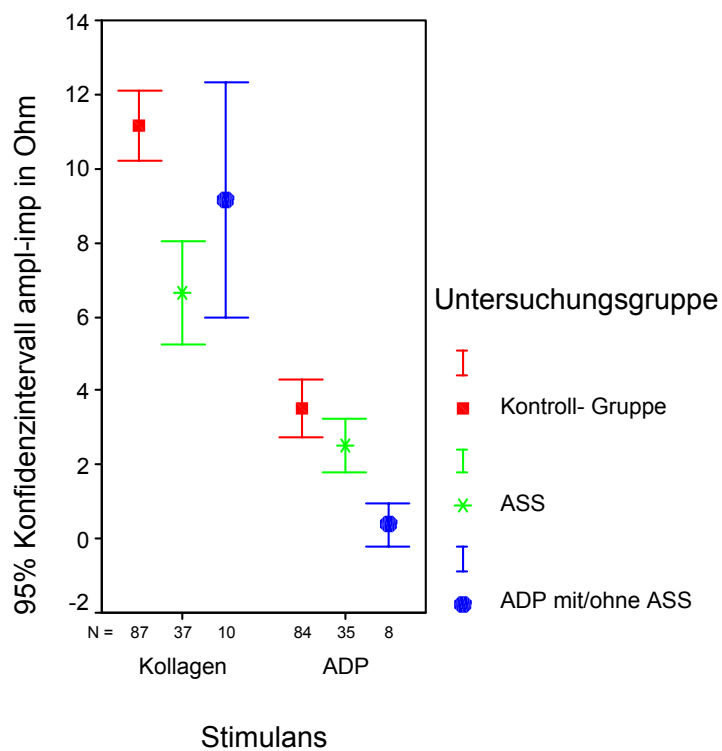


Abb. 29: Darstellung des 95% Konfidenzintervalls für die Untersuchungsgruppen

Es zeigt sich eine signifikante verminderte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation unter der Therapie mit ASS (40%,  $p < 0,001$ ) und eine nicht signifikante verminderte ADP-induzierte Plättchenaggregation für die Therapie mit Clopidogrel (89%,  $p = 0,022$ ).

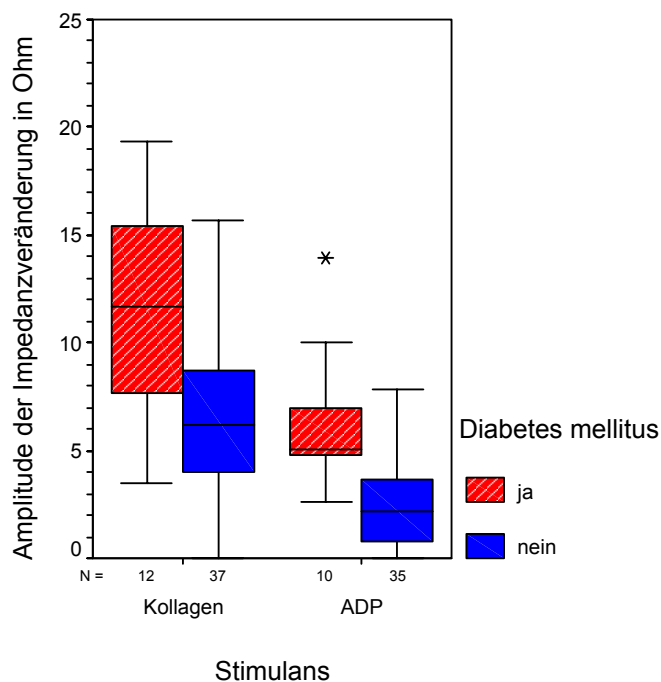
Weiter wurde der Einfluss von Diabetes mellitus Typ I oder II auf die Plättchenaggregation von Patienten mit ASS-Therapie untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 37 und 38 und den Abbildungen 30 und 31 dargestellt.

**Tab. 37: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

ASS-Therapie	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
plus Diabetes	12	67,33±9,74	11,58	11,72	5,05	1,46	$p < 0,001^*$
ohne Diabetes	37	60,00±15,22	6,63	6,22	4,21	0,69	

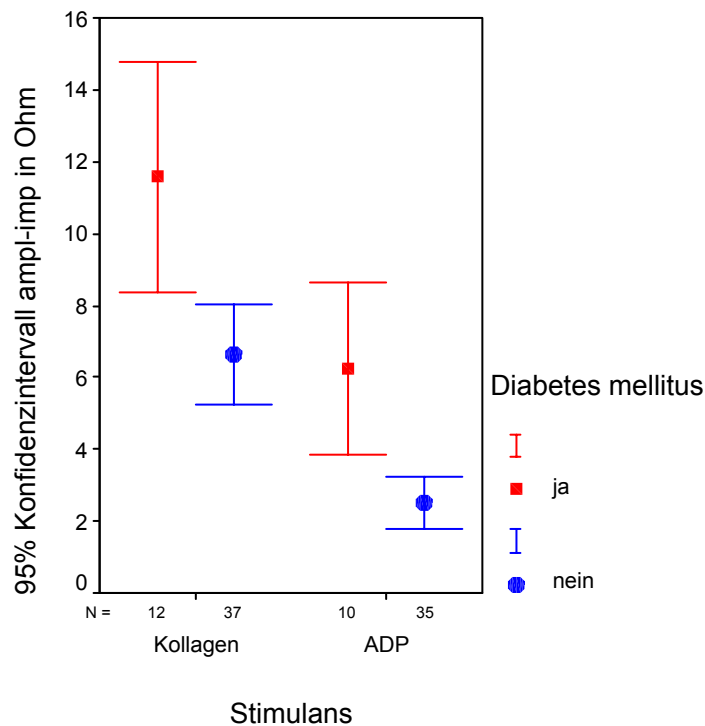
**Tab. 38: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

ASS-Therapie	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
plus Diabetes	10	69,30±7,44	6,24	5,03	3,33	1,05	$p < 0,001^*$
ohne Diabetes	35	59,94±14,68	2,51	2,17	2,13	0,36	



**Abb. 30: Darstellung der Amplitude der Impedanzänderung von Patienten mit ASS-Therapie**

Es wird die Plättchenaggregation von Patienten verglichen, die ASS einnehmen und an Diabetes mellitus erkrankt sind oder aber nicht an dieser Erkrankung leiden.



**Abb. 31: Darstellung des 95% Konfidenzintervalls für die Untersuchungsgruppen mit ASS-Therapie**

Es wird die Plättchenaggregation von Patienten verglichen, die ASS einnehmen und an Diabetes mellitus erkrankt sind oder aber nicht an dieser Erkrankung leiden.

Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Kollagen- (75%,  $p < 0,001$ ) und ADP- (149%,  $p < 0,001$ ) induzierte Plättchenaggregation für die Patienten mit ASS-Therapie und gleichzeitiger Erkrankung an Diabetes mellitus im Gegensatz zur Gruppe ASS-Therapie ohne Diabetes mellitus.

Weiter untersuchten wir den Einfluss von Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation von Patienten unter ASS-Therapie. In den Tabellen 39 und 40 sind die Messergebnisse aufgeführt.

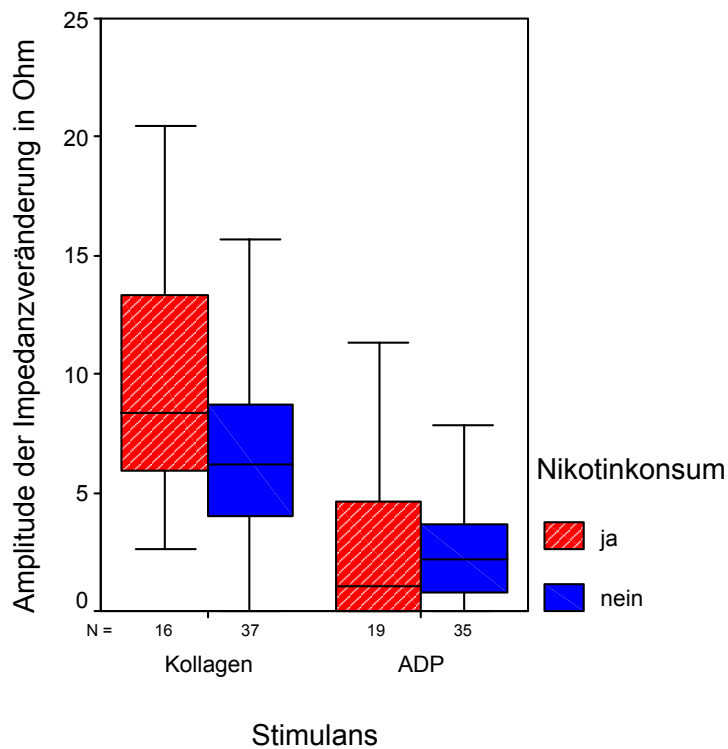
**Tab. 39: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

ASS-Therapie	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standard-Fehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
plus Nikotinkonsum	16	57,06±11,38	9,68	8,37	4,98	1,25	p=0,026*
ohne Nikotinkonsum	37	60,00±15,22	6,63	6,22	4,21	0,69	

**Tab. 40: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

ASS-Therapie	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	t-Test für die Mittelwertgleichheit
plus Nikotinkonsum	19	58,58±11,59	2,84	1,07	3,48	0,86	P=0,665
ohne Nikotinkonsum	35	59,94±14,68	2,51	2,17	2,13	0,36	

Die Abbildungen 32 und 33 veranschaulichen graphisch den Einfluss von Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation von Patienten unter ASS-Therapie.

**Abb. 32: Darstellung der Amplitude der Impedanzänderung**

Es wird die Plättchenaggregation von Patienten verglichen, die einen oder keinen Nikotinkonsum betreiben und ASS einnehmen.

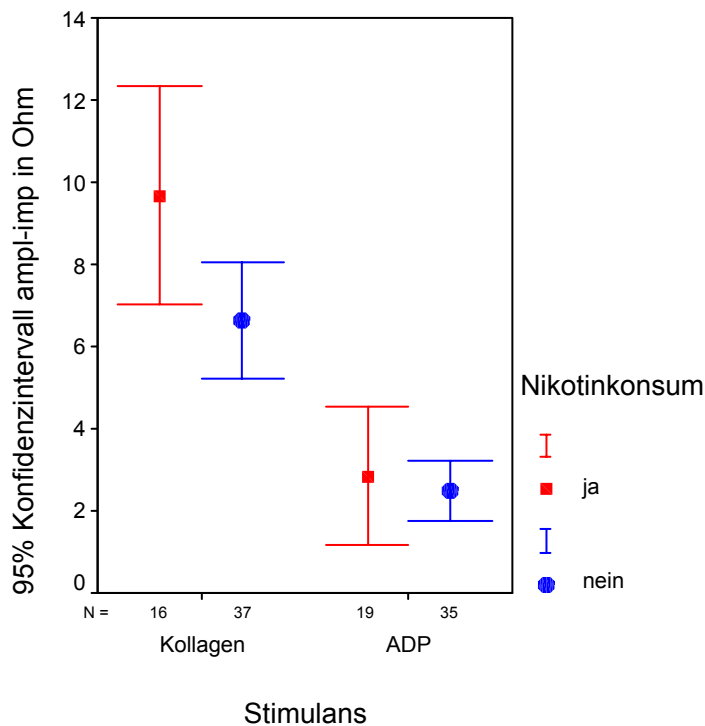


Abb. 33: Darstellung des 95% Konfidenzintervalls für die Untersuchungsgruppen

Der t-Test für unabhängige Stichproben zeigt sich eine signifikant (46%,  $p=0,026$ ) erhöhte Plättchenaggregation für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation in der Untersuchungsgruppe mit ASS-Therapie plus Nikotinkonsum.

#### 4.4 Testung der Plättchenaggregation bei Patienten mit ACE-Hemmer Therapie

Es wird der Einfluss der ACE-Hemmer Therapie auf die Plättchenaggregation untersucht und mit dem Kontroll-Kollektiv aus 4.1, mit der ASS-Therapie (siehe 4.3) und mit der Therapie ACE-Hemmer plus ASS verglichen. Die untersuchten Patienten erfüllen folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten
- Kein Diabetes mellitus, keine Depression, kein Nikotinkonsum

In den Tabellen 41 und 42 sind die gemessenen Werte aufgeführt.



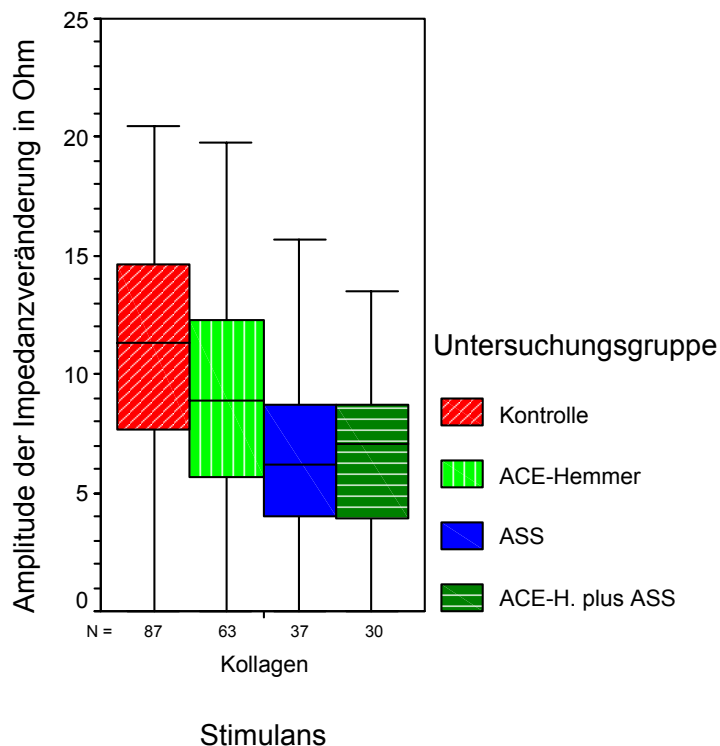
**Tab. 41: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	
ACE-Hemmer	63	66,65±10,01	8,82	8,89	4,59	0,58	p=0,009*
ASS	37	60,00±15,22	6,63	6,22	4,21	0,69	p<0,001*
ACE-H. plus ASS	30	68,10±10,61	6,72	7,04	3,56	0,65	p<0,001*

**Tab. 42: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	
ACE-Hemmer	64	66,81±10,02	2,65	1,75	3,14	0,39	0,521
ASS	35	59,94±14,68	2,51	2,17	2,13	0,36	0,620
ACE-H. plus ASS	28	68,71±10,72	1,74	0,00	2,48	0,47	0,052

Es zeigt sich im t-Test für unabhängige Stichproben eine signifikant (21%, p=0,009) erniedrigte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation in der Untersuchungsgruppe ACE-Hemmer Therapie. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 34-37 dargestellt.

**Abb. 34 Darstellung der Amplitude der Impedanzänderung nach Kollagen-induzierter Plättchenaggregation**

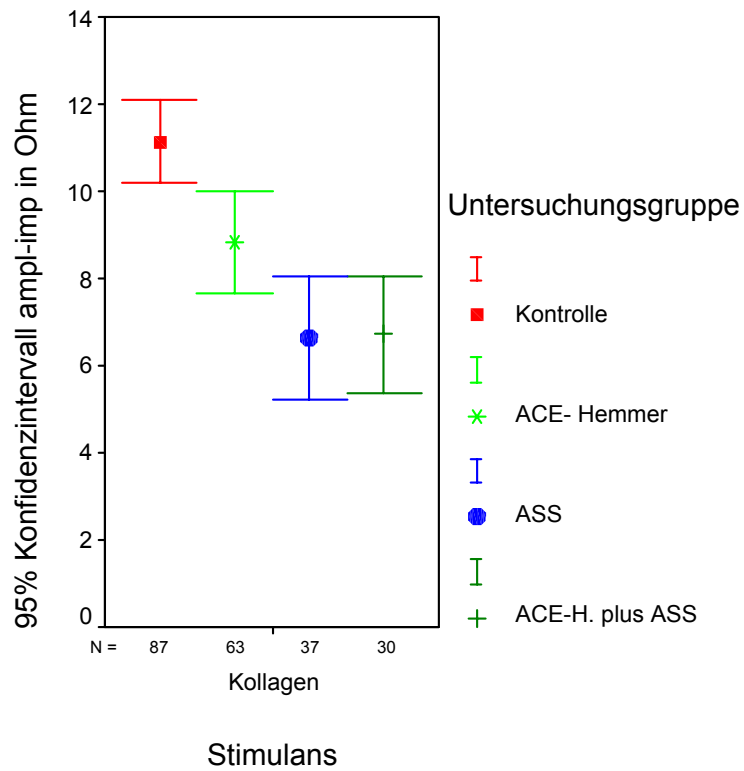


Abb. 35: Darstellung des 95% Konfidenzintervall für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

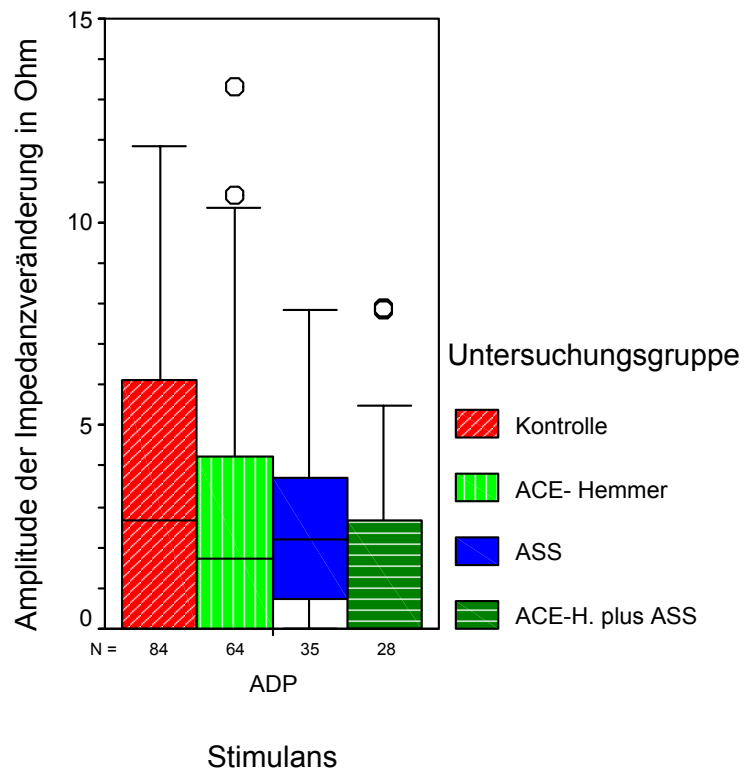
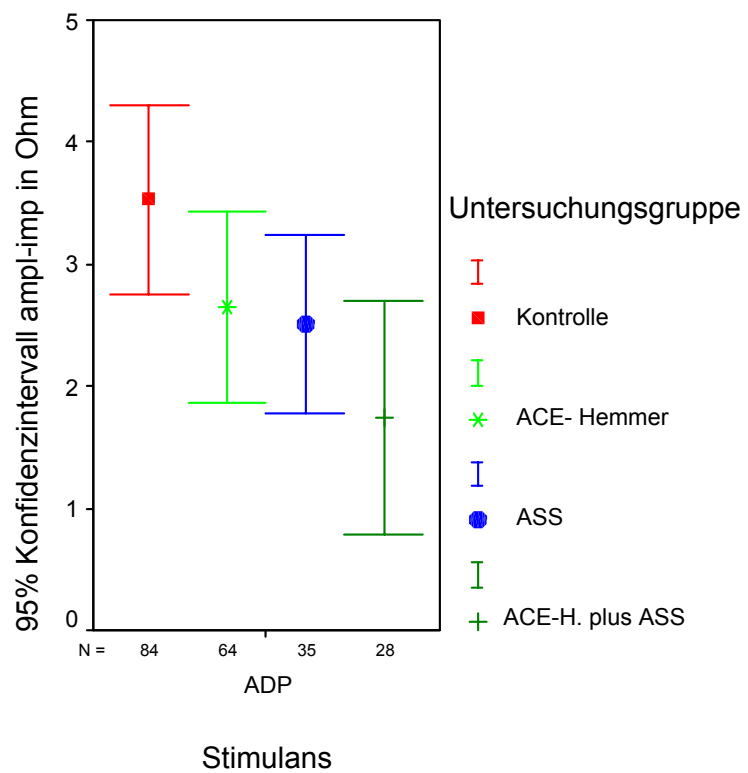


Abb. 36: Darstellung der Amplitude der Impedanzänderung nach ADP-induzierter Plättchenaggregation



**Abb. 37: Darstellung des 95% Konfidenzintervall für die ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Die Tabellen 43 und 44 zeigen eine Übersicht der Medikation und Laborwerte.

**Tab. 43: Übersicht der Medikation** (in Klammer stehen die prozentualen Werte in Bezug zur Gesamtzahl der Patienten)

Merkmal	Stimulans	
	Kollagen	ADP
Anzahl der Patienten	63	64
Mann	28 (44)	28 (44)
Frau	35 (56)	36 (56)
Alter (Jahre)	66,65±10,01	66,81±10,02
β-Blocker	27 (43)	28 (44)
Nitrate	26 (41)	26 (41)
CSE-Hemmer	25 (40)	26 (41)
Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten	15 (24)	15 (23)
Digitalis	25 (40)	25 (39)
Diuretika	32 (51)	32 (50)
Phenprocoumon	15 (24)	15 (23)
Heparin	26 (41)	26 (41)

**Tab. 44: Übersicht der Laborwerte**

Laborwert	Stimulans	
	Kollagen	ADP
CRP (mg/dl)	13,00±29,39	12,76±29,16
PTT (sec)	33,55±12,57	33,55±12,57
Quick (%)	75,47±33,03	76,13±33,14
INR	1,43±0,68	1,42±0,68
Thrombozytenzahl (1000/μl)	249,74±72,93	248,54±72,89
Kreatinin (mg/dl)	1,07±0,41	1,06±0,41
LDL (mg/dl)	140,51±46,78	139,64±46,58
HDL (mg/dl)	55,23±13,80	55,27±13,64
Cholesterin (mg/dl)	224,53±49,06	224,27±48,51
Triglyceride (mg/dl)	141±79,95	143,80±81,16

## 4.5 Testung der Plättchenaggregation bei Patienten mit AT1-Rezeptorantagonisten Therapie

Es wird der Einfluss der Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten auf die Plättchenaggregation untersucht und mit dem Kollektiv aus 4.1, dem ASS-Kollektiv aus 4.3 und dem Kollektiv Clopidogrel mit/ohne ASS aus 4.3 verglichen. Die Messwerte sind in den Tabellen 45 und 46 aufgeführt. Die Patienten in der Untersuchungsgruppe AT1-Blocker erfüllen folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit einem ACE-Hemmer
- Kein Diabetes mellitus und keine Depression
- Kein Nikotinkonsum

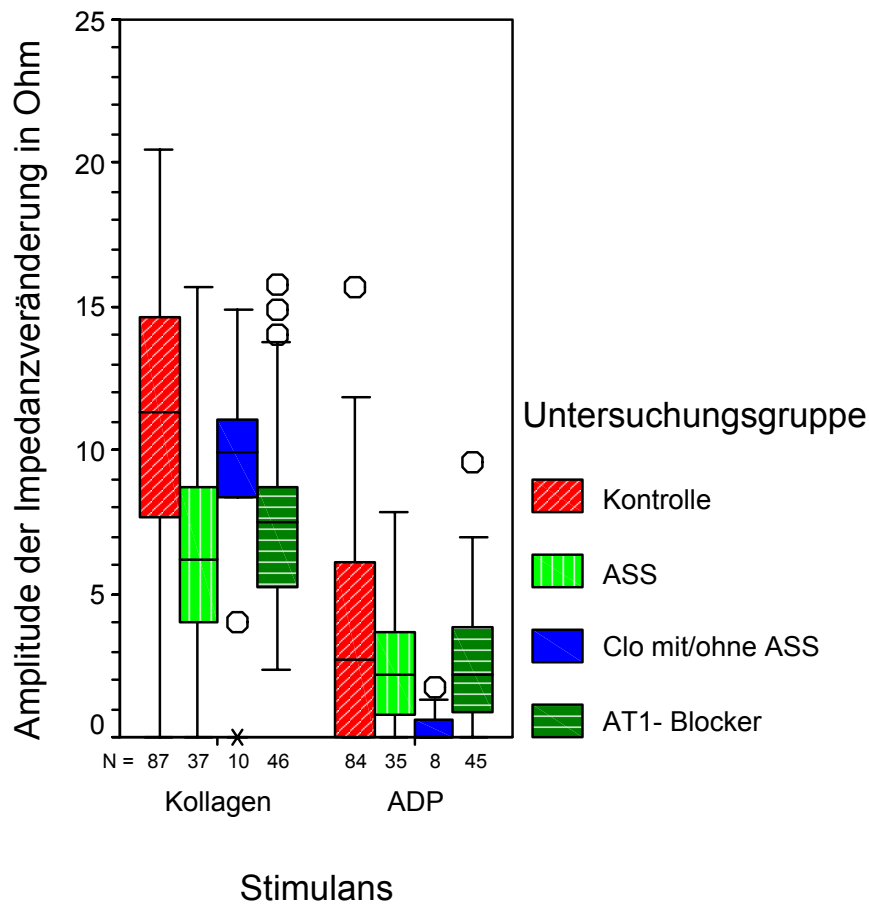
**Tab. 45: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	
ASS	37	60,00±15,22	6,63	6,22	4,21	0,69	p<0,001*
Clo m./o. ASS	10	62,80±11,57	9,14	9,90	4,44	1,40	p=0,888
AT1-Blocker	46	63,11±12,46	7,57	7,45	3,22	0,47	p<0,001*

**Tab. 46: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

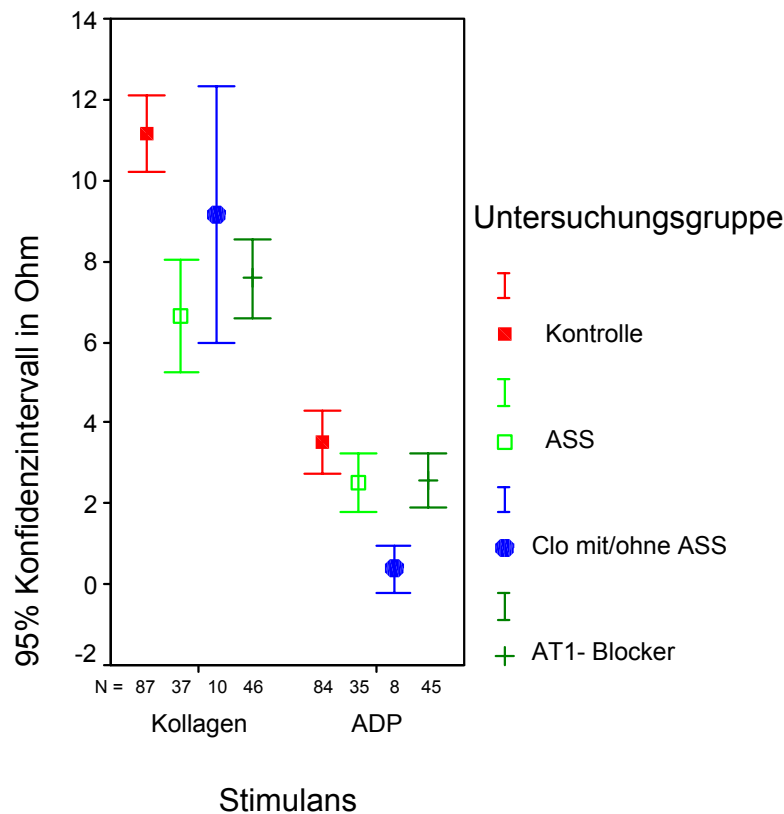
Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	
ASS	35	59,94±14,68	2,51	2,17	2,13	0,36	p=0,503
Clo m./o. ASS	8	61,63±11,25	0,38	0,00	0,71	0,25	p=0,024*
AT1-Blocker	45	62,14±12,71	2,56	2,17	2,23	0,33	p=0,449

Es zeigt sich für die Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten eine signifikante (33%,  $p < 0,001$ ) Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation. Für die ADP-induzierte Plättchenaggregation konnte keine signifikante Reduktion der Aggregation (27%,  $p = 0,449$ ) gezeigt werden. In den Abbildungen 38 und 39 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abb. 38: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation**

In der Abb. 38 wird die Plättchenaggregation des Kontroll-Kollektives aus 4.1 mit den Untersuchungsgruppen AT1-Blocker-, ASS- und Clo mit/ohne ASS-Therapie verglichen.



**Abb. 39: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation**

In der Abb. 39 sind die 95% Konfidenzintervalle für die drei Untersuchungsgruppen dargestellt.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Plättchenaggregation von Patienten mit ACE-Hemmern und AT1-Rezeptorantagonisten Therapie verglichen. Hier konnte im t-Test für unabhängige Stichproben keine signifikanten Unterschiede für die Kollagen- ( $p=0,116$ ) und ADP- ( $p=0,876$ ) induzierte Plättchenaggregation gefunden werden.

Weiter wurden Patienten untersucht, die zusätzliche zu der Therapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten eine Medikation mit ASS oder Clo mit/ohne ASS erhalten. Diese wurden dann mit der Therapie mit ASS in der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation und mit der Therapie mit Clopidogrel mit/ohne ASS in der ADP-induzierten Plättchenaggregation untersucht. In den Tabellen 47 und 48 sind die Messergebnisse aufgeführt.

**Tab. 47: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	
ASS	37	60,00±15,22	6,63	6,22	4,21	0,69	p<0,001*
AT1-B. plus ASS	14	64,50±9,14	6,04	5,11	3,04	0,81	p<0,001*
AT1-B. plus ASS/Clo	12	67,25±10,48	4,57	3,6	3,71	1,07	p<0,001*

Für alle Untersuchungsgruppen konnte eine signifikante Reduktion der Plättchenaggregation nachgewiesen werden. Weiter konnten im t-Test für unverbundene Stichproben keine additiven Effekte der Therapie AT1-Blocker plus ASS (p=0,634) bzw. AT1-Blocker plus ASS mit/ohne Clo (p=0,137) gegenüber der Untersuchungsgruppe ASS nachgewiesen werden.

**Tab. 48: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	
Clo m./o. ASS	8	61,63±11,25	0,38	0,00	0,71	0,25	p=0,057
AT1-B. plus ASS	14	64,50±9,14	2,42	1,43	2,96	0,79	p=1,000
AT1-B. plus ASS/Clo	12	67,25±10,48	0,51	0,00	1,11	0,32	p=0,032*

Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Plättchenaggregation für die Untersuchungsgruppe AT1-Rezeptorantagonist plus Clo mit/ohne ASS.

Die Abbildungen 40 und 41 veranschaulichen die Ergebnisse mit Hilfe der 95% Konfidenzintervalle.



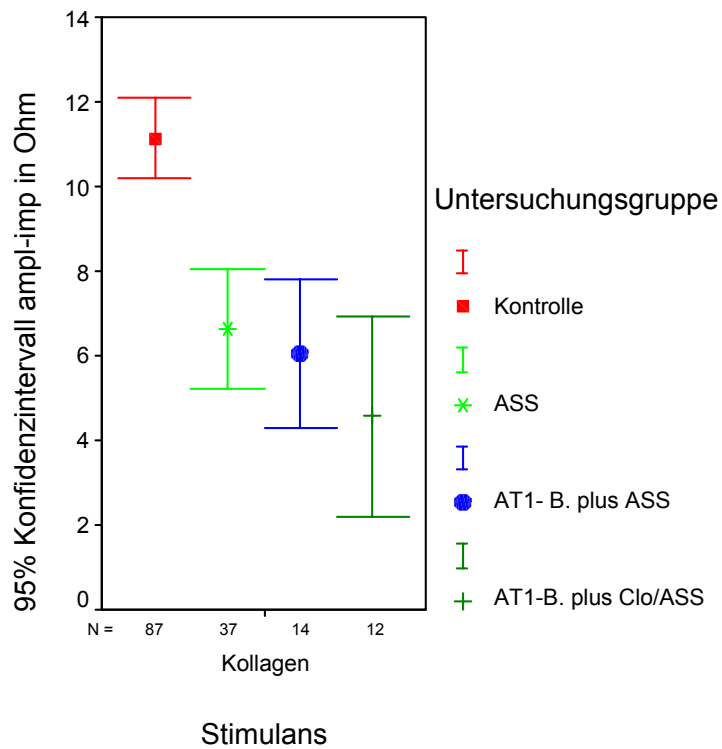


Abb. 40: Darstellung der Konfidenzintervalle für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation

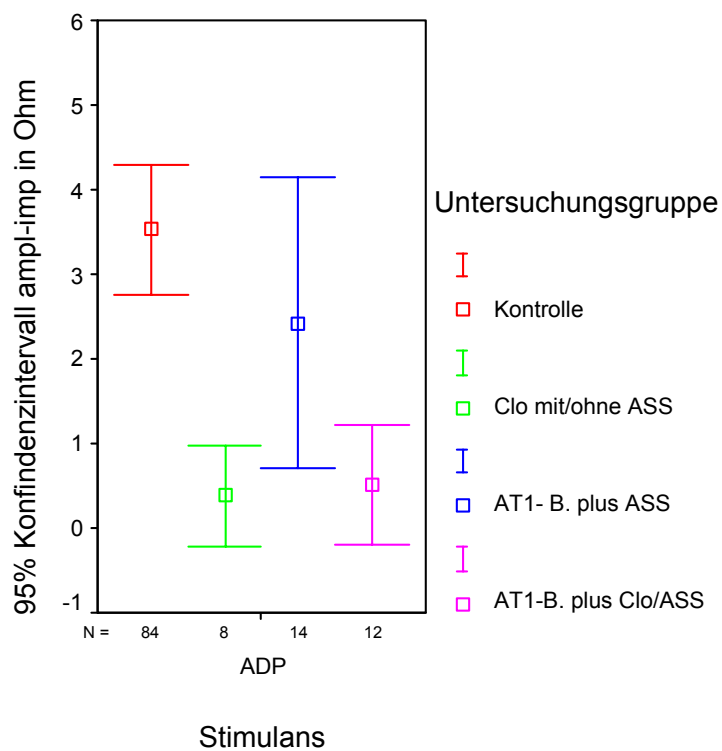


Abb. 41: Darstellung der Konfidenzintervalle für die ADP-induzierte Plättchenaggregation

Die folgenden Tabellen 49 und 50 zeigen eine Übersicht der Medikation und der Laborwerte der Untersuchungsgruppe AT1-Blocker.

**Tab. 49: Übersicht der Medikation** (in Klammern stehen die prozentualen Werte in Bezug zur Gesamtzahl der Patienten)

Merkmal	Stimulans	
	Kollagen	ADP
Anzahl der Patienten	46	45
Mann	27 (59)	26 (58)
Frau	19 (41)	19 (42)
Alter (Jahre)	63,11±12,46	60,04±12,67
β-Blocker	19 (41)	19 (42)
Nitrate	6 (13)	6 (13)
CSE-Hemmer	16 (35)	15 (33)
Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten	12 (26)	11 (24)
Digitalis	3 (7)	3 (7)
Diuretika	24 (52)	23 (51)
Marcumar	10 (22)	9 (20)
Heparin	7 (15)	7 (16)

**Tab. 50: Übersicht der Laborwerte**

Laborwert	Stimulans	
	Kollagen	ADP
CRP (mg/dl)	4,63±8,3	5,98±11,26
PTT (sec)	33,93±11,08	33,00±8,08
Quick (%)	71,67±34,58	63,14±34,26
INR	2,52±5,55	1,55±0,72
Thrombozytenzahl (1000/μl)	240±79,57	241±88,31
Kreatinin (mg/dl)	1,24±0,75	1,20±0,39
LDL (mg/dl)	116,85±32,70	114,38±21,25
HDL (mg/dl)	51,2±17,83	42,92±8,65
Cholesterin (mg/dl)	185,52±29,42	186,42±25,78
Triacylglycerine (mg/dl)	136,17±100,38	146,00±70,72

## 4.6 Differenzierte Betrachtung der Plättchenaggregation der beiden Wirkstoffe Losartan und Valsartan

Es wird untersucht, ob es Unterschiede für die beiden Wirkstoffe Losartan und Valsartan in Bezug zur Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation gibt. Es gelten die unter 4.5 aufgeführten Ausschlusskriterien.

Die Dosierungen und die gemessenen Werte sind in den Tabellen 51, 52 und 53 aufgeführt und werden in den Abbildungen 42 und 43 graphisch dargestellt.

**Tab. 51: Dosierung der Wirkstoffe Losartan und Valsartan in mg**

Wirkstoff	Mittelwert [Ω]	Standardabweichung
Losartan	60,22	19,97
Valsartan	95,38	38,43

**Tab. 52: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	87	55,06±16,81	11,14	11,31	4,46	0,48	
Losartan	23	64,68±11,01	7,72	7,44	3,49	0,73	p=0,002
Valsartan	15	55,57±13,84	7,39	7,46	2,46	0,64	p=0,004

Es zeigt sich für beide Wirkstoffe eine signifikante Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation. Zwischen beiden Wirkstoffen besteht kein signifikanter Unterschied für den Mittelwertvergleich.

**Tab. 53: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Kontrolle	84	55,10±16,68	3,53	2,67	3,56	0,39	
Losartan	21	63,75±11,09	2,98	2,58	2,51	0,55	p=1,000
Valsartan	16	54,73±13,73	1,72	1,63	1,49	0,37	p=0,121

Es zeigt sich keine signifikante Beeinflussung der ADP-induzierten Plättchenaggregation. Der Wirkstoff Valsartan zeigt einen Trend zur Reduktion. Im

t-Test für unverbundenen Stichproben zwischen der Untersuchungsgruppe Kontrolle und Valsartan zeigt sich eine signifikante Beeinflussung ( $p=0,049$ ).

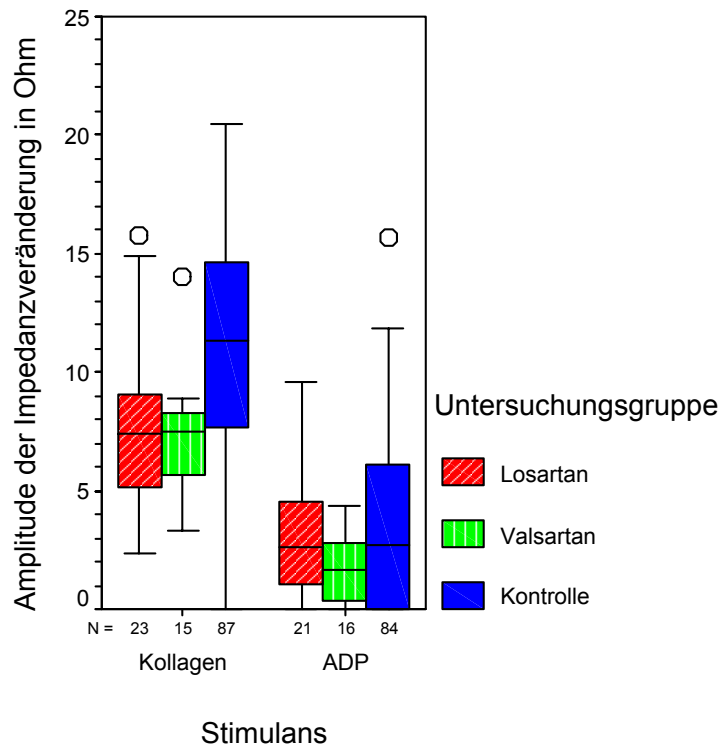


Abb. 42: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation

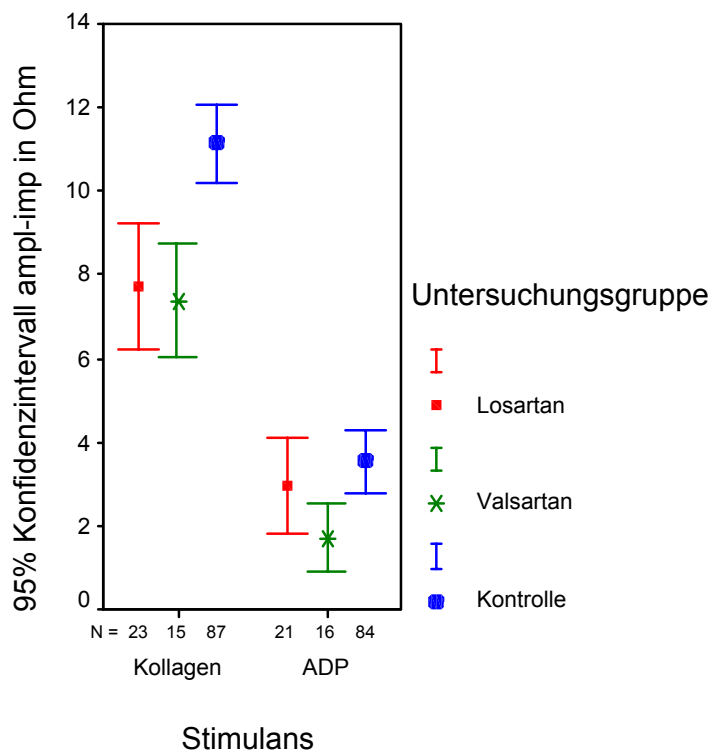


Abb. 43: Darstellung der Konfidenzintervalle der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation

## 4.7 Messung der Plättchenaggregation im Verlauf von vier Wochen bei Patienten unter Neueinstellung mit Valsartan

Es wird untersucht, in welchem Zeitraum die antithrombotischen Effekte unter Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten eintreten. Hierzu wurden zehn Patienten (4 Frauen, 6 Männer) mit arterieller Hypertonie auf den Wirkstoff Valsartan 80 mg eingestellt. Das Alter der Patienten betrug  $57,78 \pm 12,91$  Jahre. Die untersuchten Patienten erfüllten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit ACE-Hemmer
- Kein Diabetes mellitus und keine Depression
- Kein Nikotinkonsum

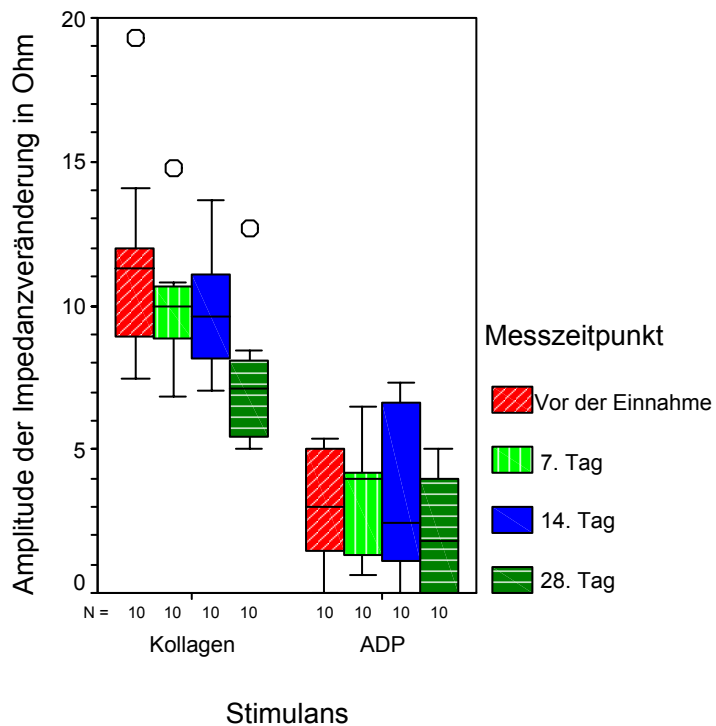
**Tab. 54: Kollagen induzierte Plättchenaggregation**

Messzeitpunkt	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Vor Einnahme	10	11,45	11,35	3,46	1,04	
7. Tag	10	10,04	10,00	2,07	0,65	1,000
14. Tag	10	9,82	9,64	2,14	0,68	0,960
28. Tag	10	7,35	7,10	2,25	0,71	0,006*

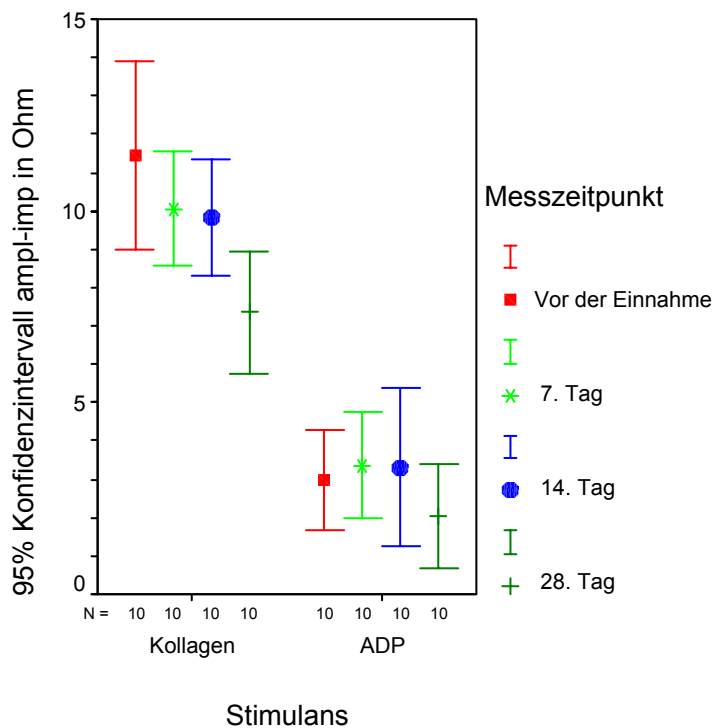
**Tab. 55: ADP induzierte Plättchenaggregation**

Messzeitpunkt	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Vor Einnahme	10	2,98	2,97	1,84	0,58	
7. Tag	10	3,36	3,96	1,95	0,62	1,000
14. Tag	10	3,32	2,44	2,91	0,92	1,000
28. Tag	10	2,04	1,85	1,87	0,59	1,000

Es zeigt sich eine signifikante ( $p=0,006$ ) Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation für den Messzeitpunkt am 28. Tag. Für die ADP-induzierte Plättchenaggregation konnte keine signifikante Beeinflussung gezeigt werden. In den Abbildungen 44 und 45 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abb. 44:** Darstellung der Plättchenaggregation der unterschiedlichen Messzeitpunkte mit Hilfe von Box-Whisker-Plots



**Abb. 45:** Darstellung der Plättchenaggregation der unterschiedlichen Messzeitpunkte

Die Abb. zeigt mit Hilfe der 95% Konfidenzintervalle der Mittelwerte den Vergleich der Messzeitpunkte für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation.

## 4.8 In vitro-Messreihe zur Testung der möglichen Modulation der Plättchenaggregation durch die Rohsubstanz Valsartan

Um zu untersuchen, ob der Wirkstoff Valsartan selbst einen direkten Einfluss auf die Thrombozytenaggregation hat, wurde eine entsprechende Verdünnungsreihe mit der Rohsubstanz hergestellt (siehe 3.3.1) und mit einer Leerprobe verglichen. Hierzu wurden die Blutproben von acht Patienten (3 Frauen, 5 Männer) mit dem Alter von  $27,00 \pm 3,21$  Jahren untersucht. Die gewählten Konzentration der einzelnen Proben richten sich nach in vivo-Studien, die gezeigt haben, dass bei einer Plasmakonzentration von 1 mg Valsartan pro Liter Plasma die maximale Blockade gegen Angiotensin II am AT<sub>1</sub>-Rezeptor erreicht wird. Schon ein Viertel dieser Konzentration reicht aus, um 50% der Rezeptoraktivität zu blockieren (siehe 3.3.1). In den Tabellen 56 und 57 sind die Messwerte aufgeführt. Die untersuchten Patienten erfüllten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS), Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten
- Kein Diabetes mellitus, keine Depression, kein Nikotinkonsum

**Tab. 56: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Probe	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Leerprobe	8	9,90	10,82	3,45	1,22	
0,23 mg/l	8	9,48	10,48	4,54	1,60	1,000
1 mg/l	8	9,16	8,01	4,61	1,63	1,000
100 mg/l	8	6,36	5,41	2,85	1,01	0,493

**Tab. 57: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Probe	N	Mittelwert [ $\Omega$ ]	Median [ $\Omega$ ]	Standardabweichung [ $\Omega$ ]	Standardfehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Leerprobe	8	3,99	3,38	2,31	0,82	
0,23 mg/l	8	4,15	4,77	2,91	1,03	1,000
1 mg/l	8	3,68	3,76	1,33	0,47	1,000
100 mg/l	8	2,04	2,27	1,11	0,39	0,399

Es zeigt sich keine signifikante Beeinflussung in der Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni für die unterschiedlichen Dosierungen gegenüber der Leerprobe. Im t-Test für unverbundene Stichproben zeigt sich eine signifikante Reduktion der Kollagen- ( $p=0,042$ ) und der ADP- ( $p=0,049$ ) induzierten Plättchenaggregation für die Proben mit der Dosierung 100 mg/l gegenüber der Leerprobe.

Die Abbildungen 46-48 veranschaulichen die Messergebnisse graphisch.

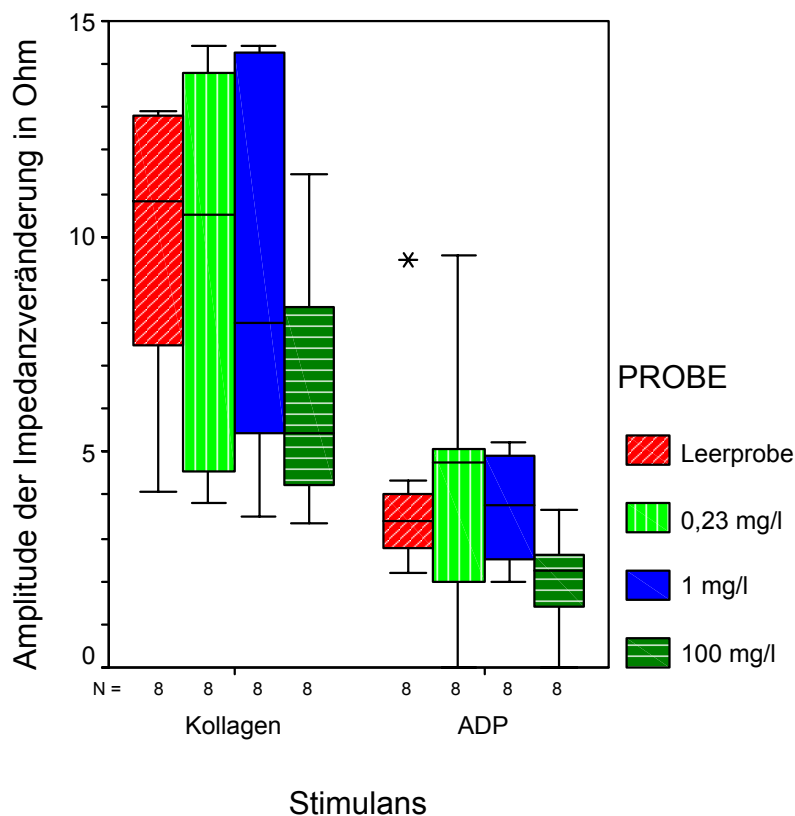


Abb. 46: Darstellung der Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation mit Hilfe von Box-Whisker-Plots



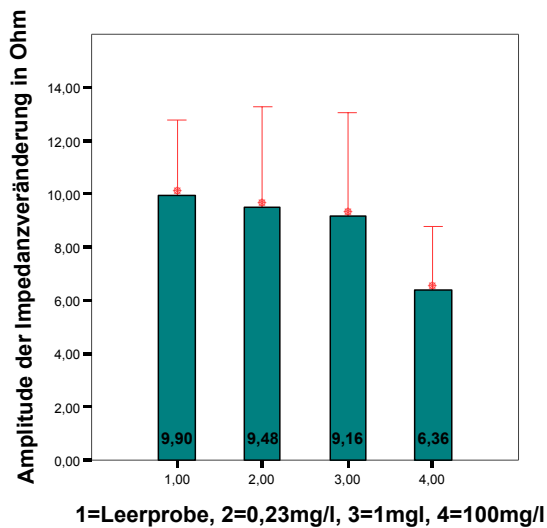


Abb. 47

Die Abb. 47 zeigt als Balkendiagramm mit den 95% Konfidenzintervallen der Mittelwerte den Vergleich der Kollektive für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation.

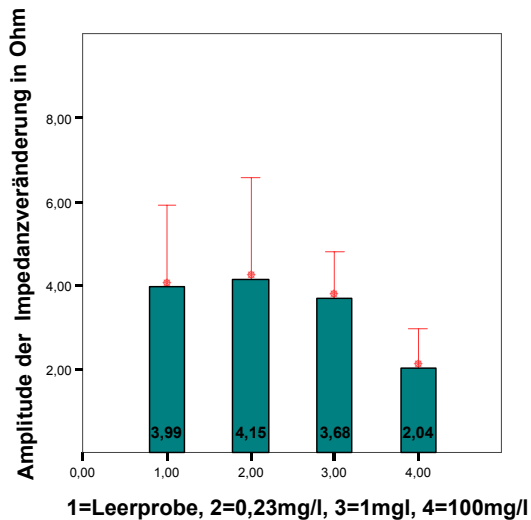


Abb. 48

Die Abb. 48 zeigt als Balkendiagramm mit den 95% Konfidenzintervallen der Mittelwerte den Vergleich der Kollektive für die ADP-induzierte Plättchenaggregation.

## 4.9 Testung der Plättchenaggregation von Diabetikern mit ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonist Therapie

### 4.9.1 Diabetiker mit ACE-Hemmer Therapie

Es wurde der Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmer auf die Plättchenaggregation von Diabetikern untersucht. Die gemessenen Werte wurde mit dem Diabetes-Kollektiv aus 4.2.1.1, dem Kollektiv Diabetes plus ASS- Therapie und dem Kollektiv Diabetes plus ACE-Hemmer/ASS-Therapie verglichen. Die Messwerte sind in den Tabellen 58 und 59 aufgeführt und in den Abbildungen 49 und 50 graphisch dargestellt. Für die untersuchten Patienten gelten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit einem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten
- Keine Depression und kein Nikotinkonsum

**Tab. 58: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Diabetes	18	62,67±13,82	14,06	15,22	4,83	1,14	
Diabetes plus ACE-Hemmer	20	65,35±10,96	9,71	9,78	4,19	0,94	p=0,022*
Diabetes plus ASS	12	67,33±9,74	11,58	11,72	5,05	1,46	p=0,823
Diabetes plus ACE-H./ASS	10	69,90±9,71	9,75	9,76	3,06	0,97	p=0,099

**Tab. 59: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Diabetes	16	62,50±14,54	3,67	3,56	3,55	0,89	
Diabetes plus ACE-Hemmer	19	67,05±9,88	3,08	2,98	2,49	0,57	p=1,000
Diabetes plus ASS	10	69,30±7,40	6,24	5,03	3,33	1,05	p=0,186
Diabetes plus ACE-H./ASS	10	69,90±9,71	2,63	2,32	1,48	0,47	p=1,000

Es zeigt sich im Gegensatz zur ASS-Therapie eine signifikante ( $p=0,022$ ) Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation für die Untersuchungsgruppe Diabetes plus ACE-Hemmer gegenüber dem Diabetes Kontroll-Kollektiv. Für die ADP-induzierte Plättchenaggregation konnte in den Untersuchungsgruppen keine signifikante Beeinflussung nachgewiesen werden. Der Vergleich des Kollektives Diabetes plus ACE-Hemmer und Diabetes plus ASS zeigt im t-Test für unabhängige Stichproben eine signifikante Reduktion für die ADP-induzierte Plättchenaggregation (51%,  $p=0,007$ ). Die Kollagen-induzierten Plättchenaggregation zeigte keine signifikante Reduktion (16%,  $p=0,268$ ).

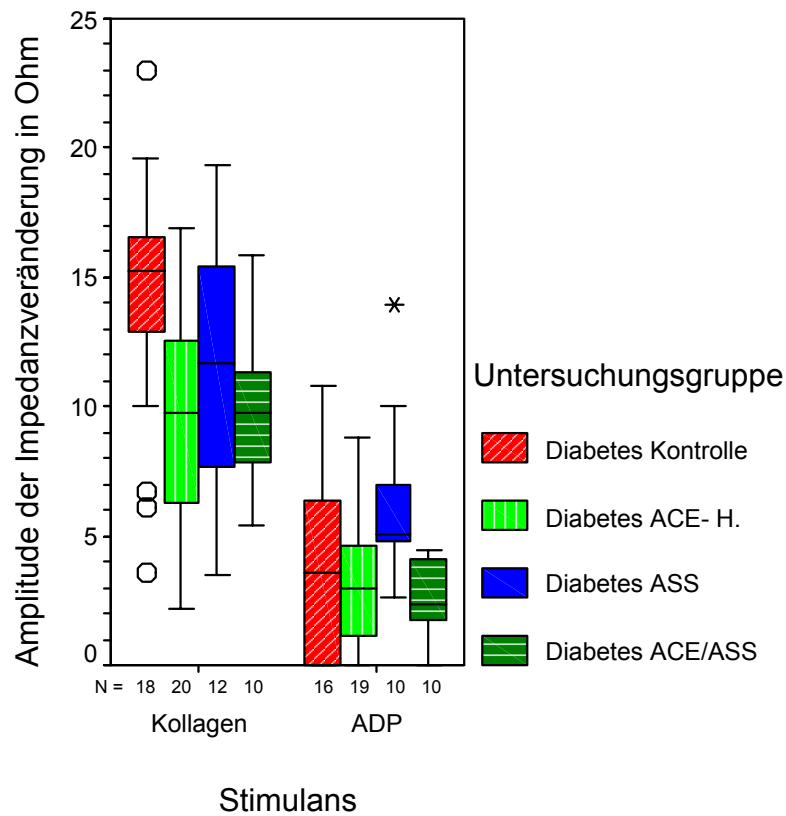


Abb. 49: Ergebnisse der Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation

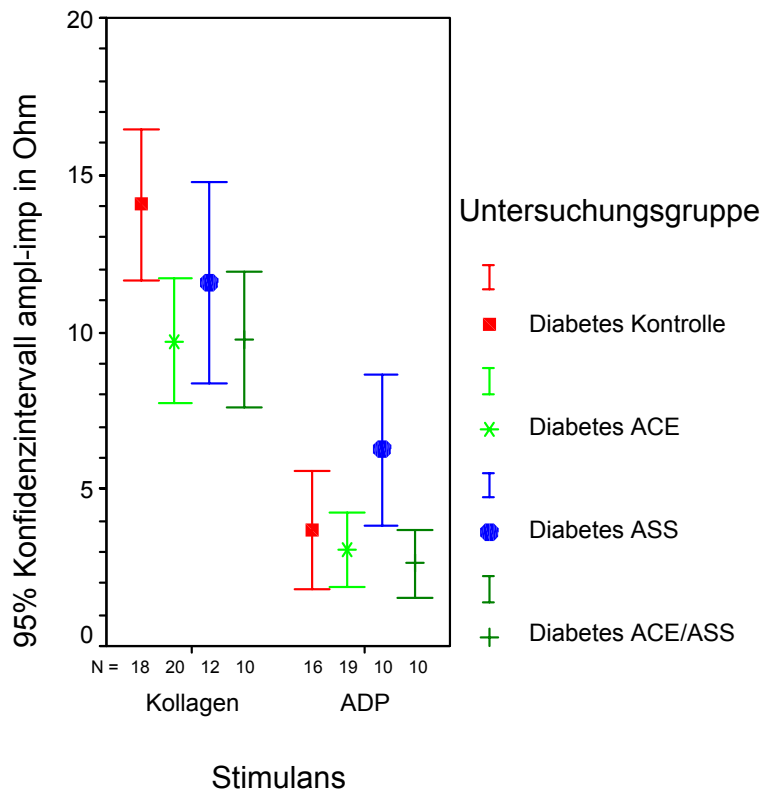


Abb. 50: Darstellung der Konfidenzintervalle der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation

#### 4.9.2 Diabetiker mit AT1-Rezeptorantagonist Therapie

Es wurde der Einfluss der Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten auf die Plättchenaggregation von an Diabetes mellitus erkrankten Patienten untersucht. Die gemessenen Werte wurde mit dem Diabetes Kollektiv aus 4.2.1.1 und dem Kollektiv Diabetes plus ASS-Therapie aus 4.3 verglichen. Es gelten folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit einem ACE-Hemmer
- Keine Depression und kein Nikotinkonsum

**Tab. 60: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Diabetes	18	62,67±13,82	14,06	15,22	4,83	1,14	
Diabetes plus ASS	12	67,33±9,74	11,58	11,72	5,05	1,46	p=0,440
Diabetes plus AT1-Blocker	10	60,60±12,39	6,6	6,92	2,80	0,89	P<0,001*

Es zeigt sich für die Untersuchungsgruppe Diabetes plus AT1-Blocker eine signifikante Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation (53%,  $p<0.001$ ) zur Untersuchungsgruppe Diabetes. Zwischen der Untersuchungsgruppe Diabetes plus ASS zu Diabetes plus AT1-Blocker zeigt sich in der Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni ein signifikanter (43%,  $p=0,041$ ) Unterschied.

**Tab. 61: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Diabetes	16	62,50±14,54	3,67	3,56	3,55	0,89	
Diabetes plus ASS	10	69,30±7,40	6,24	5,03	3,33	1,05	p=0,249
Diabetes plus AT1-Blocker	10	60,60±12,39	1,44	0,76	1,8	0,57	p=0,144

Es zeigt sich für die Patienten mit AT1-Blocker allenfalls ein Trend ( $p=0,144$ ) in der ADP-induzierten Plättchenaggregation gegenüber der Diabetes Kontrolle. Zwischen der

Untersuchungsgruppe Diabetes plus ASS zu Diabetes plus AT1-Blocker zeigte sich in der Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni ein signifikanter (77%,  $p=0,005$ ) Unterschied für die ADP-induzierte Plättchenaggregation.

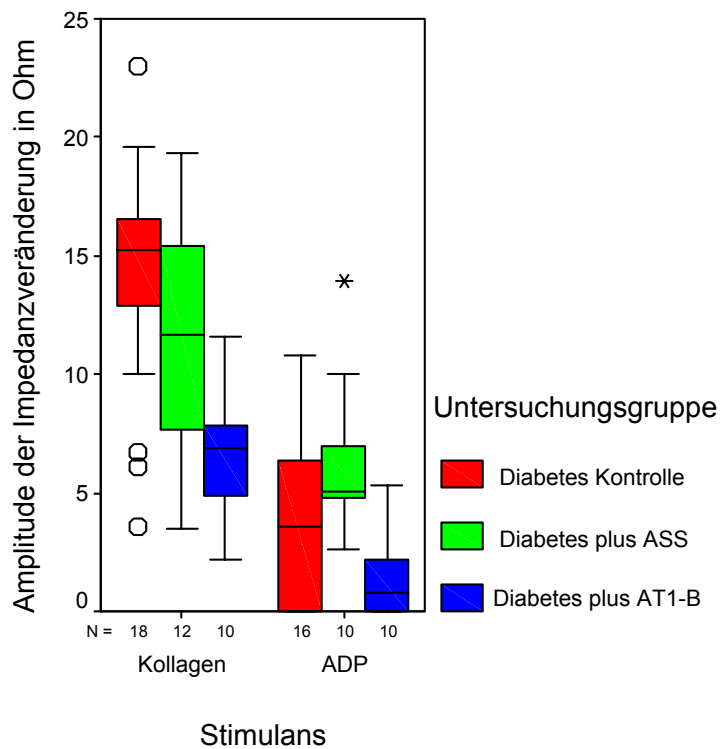


Abb. 51: Darstellung von Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation inform von Box-Whisker-Plots

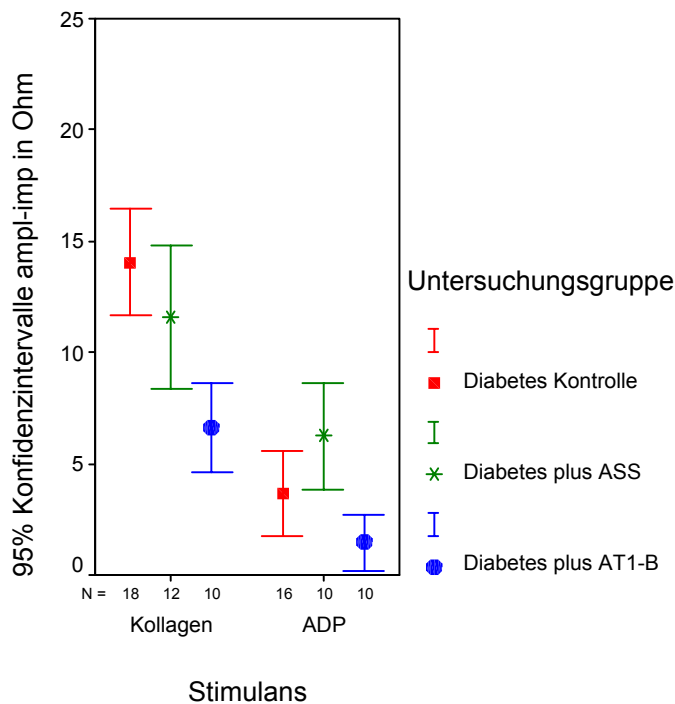


Abb. 52: Darstellung der Konfidenzintervalle der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation

#### 4.10 Testung der Plättchenaggregation bei Patienten mit Nikotinkonsum und Therapie mit einem ACE-Hemmer

Es wurde der Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmer auf die Plättchenaggregation von Patienten mit Nikotinkonsum untersucht. Die gemessenen Werte wurden mit dem Nikotin-Kollektiv aus 4.2.1.2, dem Kollektiv Nikotinkonsum plus ASS-Therapie verglichen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 62 und 63 und in den Abbildungen 53 und 54 dargestellt. Die untersuchten Patienten erfüllen folgende Ausschlusskriterien:

- Keine Therapie mit Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin
- Keine Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten
- Keine Therapie mit AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten
- Kein Diabetes mellitus, keine Depression und kein Nikotinkonsum

**Tab. 62: Kollagen-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Nicotinkonsum	31	52,58±18,85	13,72	13,33	4,23	0,76	
Nikotin plus ACE-Hemmer	14	66,57±11,03	9,67	9,45	4,7	1,26	p=0,022
Nikotin plus ASS	16	57,06±11,38	9,68	8,37	4,98	1,25	p=0,016

**Tab. 63: ADP-induzierte Plättchenaggregation**

Kollektiv	N	Alter [Jahre]	Mittelwert [Ω]	Median [Ω]	Standardabweichung [Ω]	Standard-Fehler	Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni
Nicotinkonsum	31	51,94±18,64	4,39	4,00	3,51	0,63	
Nikotin plus ACE-Hemmer	15	66,53±10,63	2,84	1,74	3,10	0,80	p=0,459
Nikotin plus ASS	19	58,58±11,59	2,84	1,07	3,48	0,80	p=0,372

In den Untersuchungsgruppen mit ACE-Hemmer und ASS-Therapie konnte nur für die Kollagen-induzierten Plättchenaggregation eine signifikante Reduktion gezeigt werden. Es zeigt sich, dass die gemessenen Werte für die beiden Untersuchungsgruppen sowohl in der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation in einem gleichem Wertebereich liegen.

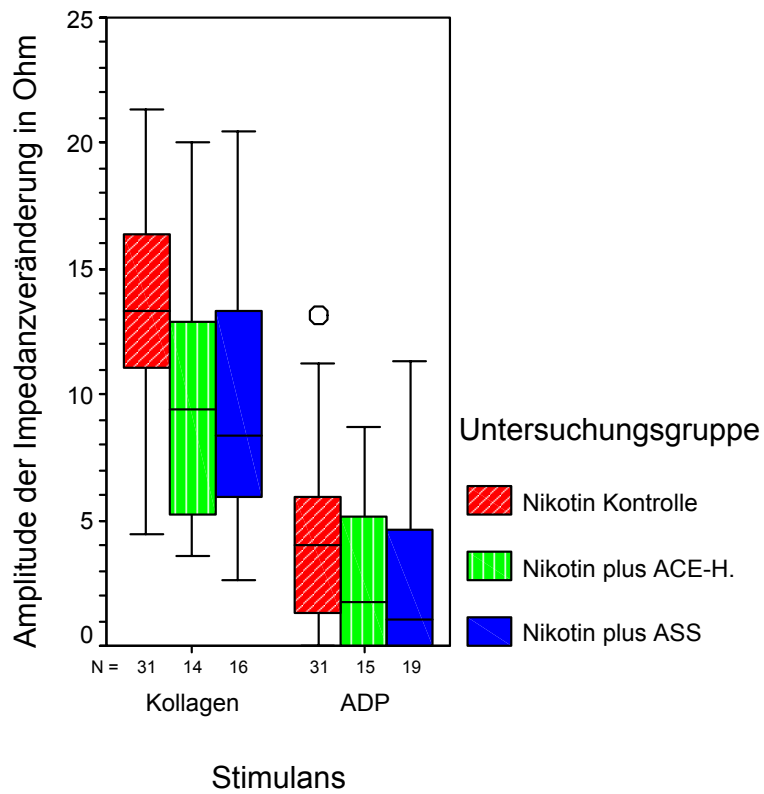


Abb. 53: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation

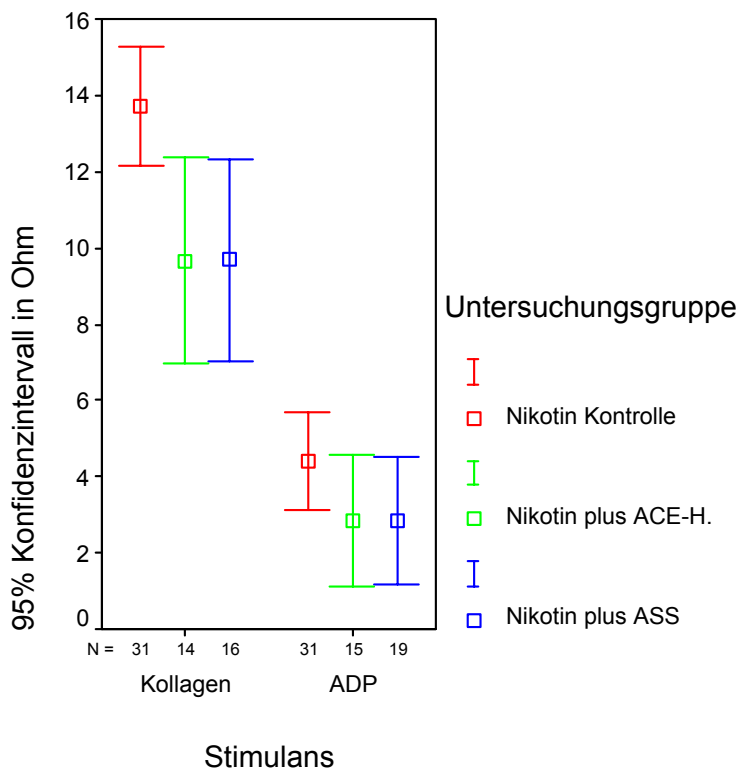


Abb. 54: Darstellung der Konfidenzintervalle der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss ausgewählter Laborparameter, Geschlecht und Alter auf die Plättchenaggregation

Die vorliegende Untersuchung der Plättchenaggregation in Abhängigkeit spezieller Laborparameter zeigt eine signifikante Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und der Amplitude der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation (siehe Abb. 11 und 12, Seite 47 und 48). Diese Ergebnisse werden gestützt durch Untersuchungen von Bowbrick et al. (2003) und Müller et al. (2001), die ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen der Thrombozytenzahl und der Plättchenaggregation nachweisen konnten. Ho und Chan (1995) stellten in ihrer Arbeit fest, dass es bei Thrombozytenzahlen zwischen  $150$  und  $500 \cdot 10^9/l$  zu keiner Beeinflussung der Plättchenaggregation kommt. Für Werte  $<150 \cdot 10^9/l$  zeigten sie eine Abnahme der Amplitude der Impedanz. Untersuchungen von Abbate et al. (1986) konnten keinen Einfluss der Thrombozytenzahl auf die Amplitude der Plättchenaggregation nachweisen.

Eine signifikante Korrelation zwischen Geschlecht und Amplitude der Plättchenaggregation konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Dies wird gestützt durch die Untersuchungen von Abbate et al. (1986) und Kasjanovová et al. (1993).

Weiter zeigen meine Untersuchungen eine Abnahme der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation ( $p=0,008$ ) mit ansteigendem Alter der Patienten. Dem gegenüber stehen Arbeiten, die eine Zunahme der Plättchenaggregation mit ansteigendem Alter zeigen (Gleerup et al., 1988; Johnson et al., 1975). Reily und Fitzgerald (1986) konnten in ihren Untersuchungen keine Korrelation zwischen Alter und Amplitude der Impedanz nachweisen.

Der Vergleich der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation in venösem und arteriellem Blut ergab keinen signifikanten Unterschied (siehe 4.1.3). Zu diesem Ergebnis kommt auch die Untersuchung von Chirkov et al. (1993).



## **5.2 Einfluss der medikamentösen Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen auf die Plättchenaggregation**

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die bei kardiovaskulären Erkrankungen häufig eingesetzten Medikamente  $\beta$ -Blocker,  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten, Nitrate, CSE-Hemmer, Digitalis, Diuretika, Phenprocoumon und Heparin keinen antithrombotischen Effekt aufweisen, obwohl z. B. für  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten (Berkels et al., 2000), CSE-Hemmer (Rosenson et al., 1998) und Nitrate (De Caterina, 1994) gerinnungshemmende Wirkungen beschrieben wurden. Diese Effekte sind sicherlich nicht auszuschließen und möglicherweise bei einer größeren Fallzahl analysierter Blutproben auch nachweisbar. Andererseits weist die Tatsache einer diesbezüglich nicht dokumentierten Inhibition der Plättchenaggregation bei gleichzeitigem Nachweis signifikanter Effekte der ACE-Hemmer (siehe 4.4) und AT1-Rezeptorantagonisten (siehe 4.5) auf die signifikante antithrombozytäre Wirkung dieser Substanzklasse hin.

## **5.3 Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum auf die Plättchenaggregation**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den Industrienationen unverändert eine der bedeutendsten Ursachen für vorzeitige Invalidität und Tod. Dies gilt für Frauen ebenso wie für Männer. Als Hauptursache für die koronare Herzerkrankung (KHK) werden neben familiären bzw. genetischen Belastungen, in ganz erheblichem Maße auch der Lebensstil der westlichen Industrienationen verantwortlich gemacht: Nikotinkonsum, fettreiche, ballaststoffarme Ernährung, geringe körperliche Aktivität, Übergewicht, Diabetes, erhöhter Alkoholkonsum und psychischer Stress tragen in variabler Kombination zur Entstehung und Progression der atherosklerotischen Erkrankungen bei (American Diabetes Association, 2004; Grundy et al., 2002). So können für fast 50% der kardiovaskulären Ereignisse die Risikofaktoren Übergewicht, eine Ernährung arm an Obst und Gemüse, Bewegungsmangel und Rauchen verantwortlich gemacht werden (Ezzati et al., 2003). Besonders die Prävalenz der Risikofaktoren Diabetes mellitus und Depression steigt in den letzten Jahren stetig an. Allein an Diabetes mellitus sind weltweit etwa 150 Millionen Menschen erkrankt. Es wird damit gerechnet, dass sich die

Prävalenzrate bis zum Jahr 2025 verdoppelt (Hauner et al., 2002; Mehnert, 2001; Scherbaum et al., 2003). So erhöht das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 die Inzidenz einer KHK auf das zwei- bis vierfache gegenüber der Normalbevölkerung (Beckman et al., 2002). In bis zu 80% der Fälle sterben diese Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 an den Folgen von Gefäßkomplikationen (Sixt et al., 2004). Haffner et al. (1998) konnten nachweisen, dass Diabetespatienten, die keine Hinweise für eine KHK aufweisen, ähnlich häufig kardiovaskuläre Ereignisse erleiden, wie nichtdiabetische Patienten nach einem Myokardinfarkt. Für Diabetiker nach Infarkt zeigte sich eine dreifach erhöhte Ereignisrate mit einer 7-Jahres Mortalität von 42%. In der 2003 veröffentlichten Hoorn-Studie wurden diese Ergebnisse bestätigt (Becker et al., 2003). Intensive Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Vorliegen eines Diabetes mellitus und der Prävalenz und Inzidenz der Depression besteht. Gavard et al. (1993) zeigten anhand einer Meta-Analyse von 9 kontrollierten und 11 unkontrollierten Studien eine drei- bis vierfach erhöhte Prävalenz depressiver Störungen bei Patienten mit Diabetes mellitus gegenüber der Gesamtbevölkerung. In einer anderen Meta-Analyse von Anderson et al. (2001), zeigte sich ein doppelt so hohes Risiko für Patienten mit Diabetes mellitus, an einer Depression zu erkranken. In einer kürzlich veröffentlichten Studie erfüllten 10-15% der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten die Kriterien einer depressiven Störung (Katon et al., 2004). Depressive Störungen bei Diabetikern erhöhen die Morbidität und Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen (Agelink et al., 2004; Clouse et al., 2003). Auch das alleinige Vorliegen einer Depression konnte als Prädiktor für das Auftreten von kardiovaskulären Endpunkten identifiziert werden (Carney et al., 2001; Rugulies, 2002; Wassertheil-Smoller et al., 1996).

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen den kardiovaskulären Risikofaktoren und der Thrombozytenfunktion herzustellen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Plättchenaggregation von Patienten mit den Risikofaktoren Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum untersucht.

### 5.3.1 Modulation der Plättchenaggregation durch den Risikofaktor Diabetes mellitus

Die vorliegende Untersuchung der Untersuchungsgruppe Diabetes mellitus zeigt für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation in einer Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni eine signifikante ( $p=0,028$ ) Erhöhung gegenüber dem Normalkollektiv (siehe 4.1). Der Unterschied für den Mittelwert betrug  $14,06 \Omega$  vs.  $11,14 \Omega$ , das entspricht einer prozentualen Veränderung von 26%. Diese Ergebnisse werden gestützt durch Befunde anderer Untersuchungen. Bridges et al. zeigten 1965 eine Thrombozytenhyperaggregabilität in Abhängigkeit vom Glucosespiegel. Weiter konnten Hughes et al. (1983) und Rosove et al. (1984) eine erhöhte Plättchenaggregation bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 für die Stimulation mit ADP, Thrombin, Kollagen, Arachidonsäure, Epinephrin im Vergleich zu gesunden Patienten nachweisen. Diese Veränderung der Plättchenaggregation kann bereits bei einer gestörten Glucosetoleranz nachgewiesen werden (Sagel et al., 1975) und beeinflusst in diesem frühen Stadium schon die Entwicklung einer Gefäßerkrankung (Mandal et al., 1993).

Pathophysiologisch kann die Erkrankung Diabetes mellitus als ein prothrombotischer Zustand betrachtet werden (siehe Abb. 55). Dieser ist bedingt durch chronische Thrombozytenhyperaggregabilität (Assert et al., 2001; Queen et al., 2003; Vinik et al., 2001), erniedrigtes fibrinolytisches Potential (Carr, 2001; Schatz, 2001), endotheliale Dysfunktion (Ceriello et al., 2004; Consentino et al., 2003; Hink et al., 2001) und durch einen Zustand chronischer Inflammation (Guha et al., 2000; Morohoshi et al., 1996).

Untersuchungen an Thrombozyten von an Diabetes mellitus erkrankten Patienten zeigen eine Volumenzunahme der Thrombozyten (Hekimsoy et al., 2004; Tschoepe, 1995), die möglicherweise durch eine Stammzellfunktion der Megakaryozyten oder durch eine chronische Aktivierung entstanden sind. Für die vergrößerten Thrombozyten von Diabetikern konnte eine erhöhte Anzahl und Aktivität der Glykoprotein-Rezeptoren nachgewiesen werden. So zeigt sich eine erhöhte Expression von GPIIb/IIIa (Fibrinogen-Rezeptor) (Keating et al., 2003), von GPIb-IX (von Willebrand Faktor-Rezeptor) (Tschoepe et al., 1990), von GPIa/IIa (Kollagen-Rezeptor), CD62 (P-Selektin) (Eibl et al., 2004; Keating et al., 2003; Yngen et al., 2004) und CD63 (Eibl et al., 2004). Die Plättchengröße, meist als „median platelet volume“ (MPV) bezeichnet, korreliert positiv mit der Anzahl an Glykoprotein-Rezeptoren und einer vermehrten Expression von

P-Selektin (Tschoepe, 1995). Ein erhöhtes MPV ist ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten eines Myokardinfarktes (Martin et al., 1991) und ein erhöhtes MPV ist assoziiert mit der proliferativen diabetischen Retinopathie (Tschoepe, 1995). Es zeigt sich in den Phospholipidmembranen von den aktivierten Thrombozyten eine höhere Konzentration von Arachidonsäurederivaten mit vermehrter Bildung von  $\text{TxA}_2$  und  $\text{PGH}_2$ . Eine vermehrte Bildung von  $\text{TxA}_2$  konnte sowohl in vitro mit plättchenreichem Plasma (Halushka et al., 1981) als auch in vivo (Davi et al., 1990; Tomaselli et al., 1990), dokumentiert durch eine erhöhte Urinausscheidung, gezeigt werden. Eine erhöhte Bildung von  $\text{TxA}_2$  führt zu einem erhöhtem Thrombozytenumsatz und einer erhöhten Fibrinogenbindung. Weiter kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Plättchenfaktor 4 und  $\beta$ -Thromboglobulin (Small et al., 1986), zu einer vermehrten Produktion von Faktor-VIII-Antigen und zu einer erhöhten Expression von Thrombospondin ( $\alpha$ -Granula), was insgesamt zu einer erhöhten Plättchenaggregation führt. Auf dem aktivierten Thrombozyten werden ebenfalls vermehrt CD40-Liganden exprimiert (Jinchuan et al., 2004). Diese binden an die Endothelzellen und Monozyten und stimulieren so die tissue factor-Produktion, die Synthese von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP). Der CD40-Ligand induziert auch ein Entzündungssignal in den Zellen der Gefäßwand und fördert durch die Stimulation von GPIIb/IIIa die Expression von CD40 und CD62 (P-Selektin) (Freedman et al., 2002). Untersuchung der intrazellulären Mechanismen der Thrombozyten haben eine reduzierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität und eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nachgewiesen, was zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einer erhöhten Plättchenaktivität führt (Li et al., 2001).

Ein weitere Ursache für die endotheliale Dysfunktion (Ceriello et al., 2004; Consentino et al., 2003; Hink et al., 2001) und Inflammation (Guha et al., 2000; Morohoshi et al., 1996) bei Diabetikern ist die nicht-enzymatische Glykosylierung (advanced glycation end products, AGE), eine erhöhte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), eine verminderte NO Produktion, oxidativer Stress (Ceriello et al., 2004) und hämodynamische Veränderungen. Diese Ursachen werden im folgenden Text in Bezug zur Plattenaggregation erläutert.

Durch die Hyperglykämie und die erhöhten Spiegel freier Fettsäuren, sowie durch die Insulinresistenz kommt es zu einer Inhibition der endothelialen NO-Produktion und der

Bioverfügbarkeit (Nesto, 2004). So konnten Balletshofer et al. (2000; 2003) eine Assoziation zwischen der flussassoziierten Vasodilatation als Marker für die Endothelfunktion einerseits und der Insulinsensitivität andererseits nachweisen. Er zeigt, je besser die Insulinsensitivität, umso besser auch die Endothelfunktion, bzw. je geringer die Insulinwirkung, umso schlechter die Endothelfunktion. Es konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Hyperglykämie zu einer erhöhten Produktion von Diacylglycerol kommt, ein „lipid second messenger“ was zu einer Aktivierung von verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C (PKC) führt (Assert et al., 2001; Craeger et al., 2003). Die Folge ist eine erhöhte Aktivität verschiedener Oxidasen (z.B. NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidase), mit vermehrter Bildung freier Sauerstoffradikale. Diese Superoxydanionen und NO reagieren zu Peroxynitrit, worauf eine Oxidation von Tetrahydrobiopterin, dem Co-Faktor der NO-Synthetase (NOS), folgt. Damit ist die NO-Synthetase entkoppelt und produziert statt NO in vermehrtem Maße Superoxidanionen, womit ein Circulus vitiosus entsteht. Ein erhöhter Spiegel an PKC inhibiert auch die Aktivität von Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathways (PI3-K), mit der Folge einer gestörten Phosphorylierung der NOS und führt somit zu einer verminderten NO-Produktion. Für den PI3-K Pathway spielt auch die Insulinwirkung eine wichtige Rolle. Denn es konnte gezeigt werden, dass Insulin in seinen Zielorganen sowohl den PI3-K Pathway als auch den mitogen-aktivierten Proteinkinase-Pathway (MAPK) stimuliert (Hsueh et al., 2003). Die Aktivierung des PI3-K-Pathway ist für die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in das Zielorgan und für die Regulation der insulinabhängigen endothelialen NO-Produktion verantwortlich. Eine verminderte Aktivität des PI3-K-Pathway, bedingt durch einen erhöhten Spiegel an PKC, führt zu einer vermehrten Stimulation des MAPK-Pathways. Über diesen Weg stimuliert Insulin das Zellwachstum von glatten Muskelzellen und die Migration von Monozyten. Weiter werden eine erhöhte Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), ICAM-1 und MCP-1 vermittelt. Der Endothelin-1-Spiegel (ET-1) steigt auch in Folge eines erhöhten Spiegels der PKC an. Hieraus resultiert eine Störung der Mikrozirkulation und eine Induktion der Expression proinflammatorischer Zytokine. Es zeigen sich erhöhte Spiegel des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), von TGF- $\beta$  (steigern die Kollagen- und Fibronectinbildung) und von PAI-1 (behindert endogene Fibrinolyse). Durch die Hyperglykämie-bedingte Stimulation der PKC kommt es auch zu einer vermehrten

Bildung der induzierbaren Cyclooxygenase 2 (COX-2) (Consentino et al., 2003). Dies führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von vasodilatierenden (Prostaglandin  $I_2$ ) zu vasokonstringierenden, proatherogenen Prostanoiden (Thromboxan  $A_2$ ). Eine weitere charakteristische Konstellation bei Diabetes ist ein erniedrigtes HDL-Cholesterin (HDL-C) und eine Hypertriglyzeridämie, wodurch erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren (FFA) entstehen. Diese Konstellation besteht auch in der vorliegenden Untersuchung. Hier sind die Triglyzeride auf einen Mittelwert von 169,14 mg/dl erhöht und das HDL-C auf 38,31 mg/dl erniedrigt. Grund hierfür ist die Insulinresistenz der Adipozyten, wodurch die Insulin-vermittelte Suppression der Lipolyse gestört ist und es so zu einer erhöhten Freisetzung von FFA kommt (Kwiterovich, 2000). Das erniedrigte HDL-C führt zur vermehrten Lipidoxidation im LDL-C Partikel. Die Folge der oxidierten Phospholipide im LDL-C ist eine stimulierte Produktion von MCP-1, IL-8 und MCS-F, was zu einer erhöhten Adhäsion von Monozyten an die Endothelzelloberfläche führt (Assmann et al., 2004). Bei Patienten mit Diabetes mellitus, Insulinresistenz, gestörter Glukosetoleranz und auch bei Patienten mit Hypertonie und Hypertriglyzeridämie werden erhöhte Spiegel an asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) gemessen. Diese Substanz ist dem L-Arginin chemisch ähnlich und blockiert so die NOS und damit die Bildung von NO. Erhöhte ADMA-Spiegel sind assoziiert mit dem Auftreten von Atherosklerose, pAVK, Insult und Herzinsuffizienz (Börger, 2004). ADMA steigert die Bildung von freien Sauerstoffradikalen, erhöht die Monozyten- und Thrombozytenadhäsivität an das Endothel und aktiviert NF- $\kappa$ B.

Ein ganz entscheidender Mechanismus in der Progression der Atherosklerose bei Diabetikern ist der Anstieg der nicht-enzymatischen Glykolisierung von Proteinen und Lipiden mit der Bildung und Ablagerung von „advanced glycation end products“ (AGE) (Takeuchi et al., 2001). Es kommt durch AGE zu einer gestörten Integration und Funktion von Gefäßen, hierdurch wird eine Adhäsion von Zellen an das Endothel begünstigt. Die Interaktion von AGE mit seinem Rezeptor (RAGE) an der Endothelzelloberfläche führt zu Bildung von ROS (Schmidt et al., 1994), was den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert. Die Folge ist ein Anstieg von TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-8, Interferon- $\gamma$  (Beckman et al., 2002). Weiter kommt es zu einer Induktion der Expression von tissue factor und zu einer Reduktion der Expression von Thrombomodulin, wodurch eine prokoagulatorische Oberfläche entsteht. Es kommt in

Folge zu einer vermehrten Interaktion von Monozyten mit dem Endothel. Durch die Interaktion von AGE werden die Makrophagen aktiviert. Sie sezernieren „platelet derived growth factor“ (PDGF), „insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) sowie IL-1 und TNF- $\alpha$  und induzieren die Zellmigration. AGE ist neben der Blockade der NOS auch in der Lage, Endothelin-1 zu induzieren (Basta et al., 2004; Quehenberger et al., 2000). Durch die Glykosylierung der Membranproteine der Thrombozyten, verändern diese ihre Membranfluidität (Winocour et al., 1992). Hierdurch sind die Membranrezeptoren den verschiedenen Stimulatoren länger ausgesetzt, was zu einer Hypersensitivität der Thrombozyten beiträgt.

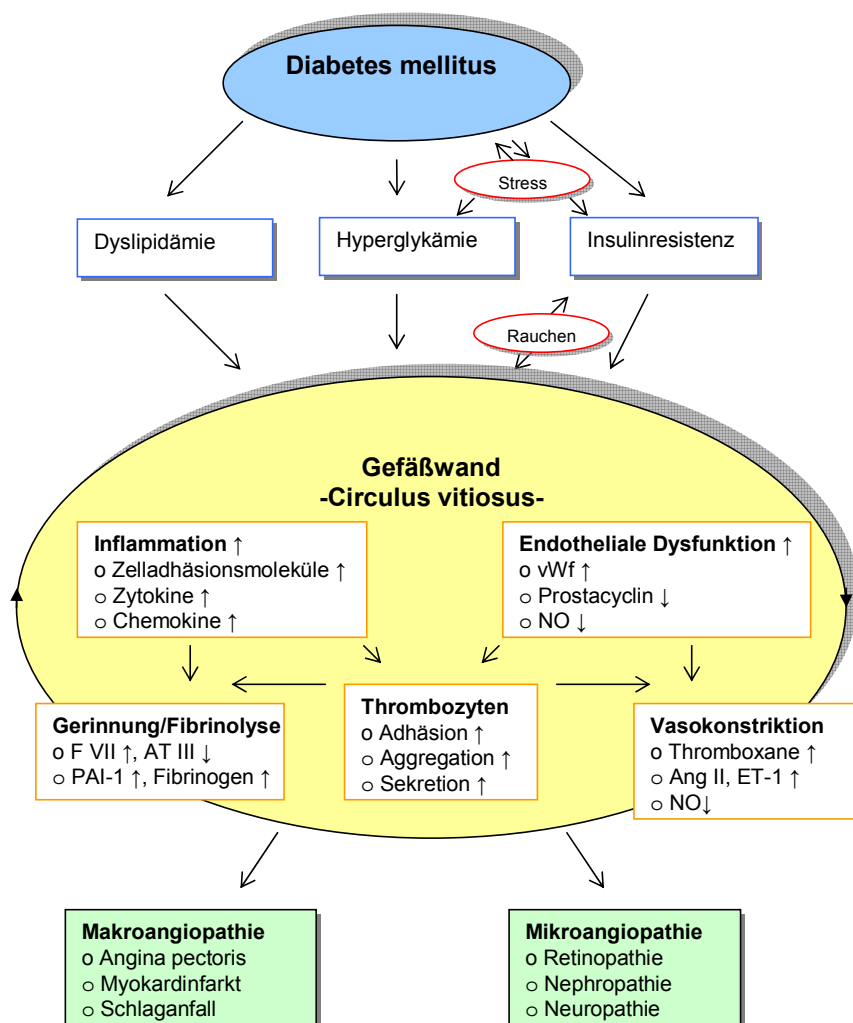


Abb. 55: Zusammenfassung der Pathogenese der diabetischen Angiopathie

Ziel der therapeutischen Intervention muss zunächst die Korrektur des Lebensstils mit Körpergewichtsnormalisierung, eine Umstellung der Ernährung und eine ausreichende

körperliche Bewegung sein (Wirth, 2003). Medikamentös sollte der Diabetes mellitus früh auf die Zielwerte HBA1c <6,0-6,5% eingestellt werden. Eine bestehende Hypertonie und eine bestehende Lipidstörung ist zu korrigieren und mit einer medikamentösen Thrombozytenfunktionshemmung sind zu beginnen (Hauner et al., 2003).

#### 5.3.1.1 Beeinflussung der Plättchenaggregation durch die Therapie mit ASS bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten

Die Hemmung der Plättchenaggregation mit ASS ist ein Eckpfeiler in der Therapie der Atherosklerose. Eine aktuelle Meta-Analyse zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse unter Therapie mit ASS zeigt, dass der Benefit einer ASS-Therapie mit höherem kardiovaskulärem Risiko steigt (Hayden et al., 2002). Es zeigte sich aber, dass die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch ASS bei Patienten mit Diabetes weniger effektiv ist, als bei Patienten mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren (Sacco et al., 2003; Watala et al., 2004). Auch in den hier dargestellten Ergebnissen kann ein schlechteres Ansprechen auf ASS für die Patienten mit Diabetes mellitus gezeigt werden. Hier zeigte sich im t-Test für die Mittelwertgleichheit ein signifikanter Unterschied für die Kollagen- und ADP-induzierte Plättchenaggregation im Vergleich zur Wirkung bei Patienten ohne Diabetes mellitus. Die Betrachtung der 95% Konfidenzintervalle verdeutlicht nochmals die vorliegenden Ergebnisse (siehe Abb. 31, Seite 69). Die Ergebnisse sind wahrscheinlich in einer verminderten Sensitivität der Thrombozyten von Diabetikern für eine antithrombotische Therapie mit ASS begründet. Der genaue Mechanismus dieser „ASS-Resistenz“ ist bisher nicht bekannt. Mögliche Erklärungsansätze sind ein erhöhter Thrombozyten Turnover (Zimmerman et al., 2003), eine erhöhte inflammatorische Aktivität (Inflammation induziert COX-2 Expression in Monozyten-Makrophagen als eine zusätzliche Quelle für Endoperoxide und folglich für die Thromboxan A<sub>2</sub> Bildung) (Ceriello et al., 1996; Halushka et al., 2002; Mori et al., 1992; Weber et al., 1999), eine durch die Hyperglykämie bedingte Glykosylierung der Plättchenmembran, eine Tachyphylaxie bei Langzeittherapie (Pulcinelli et al., 2004) und eine COX unabhängige erhöhte Produktion von Thromboxan (Ceriello et al., 1996; Mori et al., 1992; Patrono et al., 2003, 2005). Aber auch die Faktoren Stress (Li et al., 1999), Hypercholesterinämie (Friend et al., 2003) und eine bestehende Hypertension (Meade et al., 2000) könnten die „ASS-Resistenz“ bei Patienten mit Diabetes mellitus fördern.



Für die Effektivität der Therapie mit den Thienopyridinen Ticlopidine und Clopidogrel bei Diabetikern sind nur wenige Studiendaten zur Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse vorhanden. Eine retrospektive Analyse der CAPRIE-Studie (20% der Patienten hatte einen Diabetes mellitus) unter besonderer Betrachtung der Patienten mit Diabetes mellitus und einer Vorgeschichte mit einem atherothrombotischen Ereignis zeigte für die Therapie mit Clopidogrel (75 mg) eine höhere Effektivität in der Verhinderung wiederkehrender ischämischer Ereignisse gegenüber der Therapie mit ASS (325 mg) (Bhatt et al., 2002).

### **5.3.2 Modulation der Plättchenaggregation durch den Risikofaktor Depression**

Im folgenden Text wird die Plättchenaggregation der Patienten mit einer diagnostizierten Depression besprochen. Wie wichtig eine detaillierte Betrachtung der Depression als ein kardiovaskulärer Risikofaktor ist, erkennt man bereits an der unter 5.3 genannten Korrelation von Diabetes mellitus und Depression. In mehreren Studien konnte für Patienten mit Depression ein erhöhtes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis gezeigt werden (Ariyo et al., 2000; Aromaa et al., 1994; Ferketich et al., 2000; Hippisley-Cox et al., 1998). In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigte sich eine erhöhte Prävalenz einer Depression bei Patienten mit KHK und nach einem Myokardinfarkt (Lynda et al., 2005). Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Plättchenaggregation von Patienten gemessen (siehe hierzu 4.2.1.1), bei denen nach ärztlicher fachpsychiatrischer Anamnese eine Depression diagnostiziert wurde. So zeigte sich in den aktuellen Messungen eine signifikant erhöhte ADP-induzierte Plättchenaggregation gegenüber dem Normalkollektiv aus 4.1 (58%,  $p=0,004$ ). Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls eine erhöhte Plättchenaggregation nachweisen konnten (Anfossi et al., 1996; Musselman et al., 1998). Wichtige Punkte der Pathophysiologie der erhöhten Plättchenaggregation sind eine erhöhte Inflammation (Laghrissi-Thode et al., 1997; Maes et al., 2001; Serebruany et al., 2003; Zorrilla et al., 2001), ein erhöhter Spiegel an vasoaktiven Substanzen wie Cortisol, Katecholaminen und Serotonin (Gotthardt et al., 1995; Kop et al., 2002; Shimbo et al., 2002) und eine erhöhte arterielle Rigidität, bedingt durch eine erhöhte Ansammlung von Albumin, Lipoproteinen und Cholesterol in der Intima und Media (Et-Taouil et al., 2003). Zur detaillierten Evaluierung der Plättchenaggregation depressiver Patienten und deren

Beeinflussung durch Antidepressiva läuft zurzeit eine Studie in unserer Arbeitsgruppe. Die Ergebnisse werden sicher weitere Fragen im Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und der Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse beantworten.

### **5.3.3 Modulation der Plättchenaggregation durch den Risikofaktor Nikotinkonsum**

In der Untersuchung der Thrombozytenfunktion von 31 Patienten mit Nikotinkonsum (siehe 4.2.1.2), zeigt sich für den t-Test für die Mittelwertgleichheit eine signifikant erhöhte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation im Vergleich zum Normalkollektiv (23%,  $p=0,006$ ). Hier zeigte sich ein Unterschied für den Mittelwert von 13,72  $\Omega$  vs. 11,31  $\Omega$ . Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen, die eine Thrombozytenhyperaggregabilität für Patienten mit Nikotinkonsum zeigen. So zeigten experimentelle Studien mit Tabak-Glukoprotein Produkten eine erhöhte mRNA Expression von IL-1, IL-6 und PDGF in alveolaren Epithelzellen (Francus, 1992) und eine erhöhte Freisetzung von M-CSF (macrophage-colony-stimulating factor) aus Lungenmakrophagen (Rose et al., 1992). M-CSF wird vor allem bei der Atherosklerose aus vaskulären Makrophagen und geschädigtem Endothel freigesetzt (Rajavashisth et al., 1990) (siehe auch 1.4.2) und induziert die Monozyten/Makrophagen Aktivierung (Roth et al., 1992), die Adhäsion und Aktivierung der Plättchen und führt zur Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) aus den Thrombozyten. Weiter führt M-CSF zu einer gesteigerten Expression von tissue factor (Lyberg et al., 1987; Narahara et al., 1994), zu einer Freisetzung von IL-6 aus vaskulären Monozyten (Bauer et al., 1988) und so zur Produktion von C-reaktivem Protein (Bataille et al., 1992). Da bei Patienten mit Nikotinkonsum ein erhöhter Spiegel an Thromboxan A<sub>2</sub> (Nowak et al., 1987; Patrono et al., 1992), an IL-6 und ein erhöhter CRP-Plasmaspiegel (Rode et al., 1999) bei sonst gesunden Patienten, sowie eine erhöhte Expression von tissue-factor (Matetzky et al., 2000) in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnte, lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem Nikotinkonsum und der Bildung von M-CSF vermuten. Dieser Zusammenhang konnte in einer aktuellen Studie von Ikonomidis et al. (2005) belegt werden. Hier konnte für das Raucher-Kollektiv ein dreifach erhöhter Spiegel an M-CSF und ein zweifach erhöhter CRP-Spiegel gezeigt werden. In meinen

Untersuchungen fand sich auch ein gegenüber dem Normalkollektiv aus 4.1 erhöhter CRP-Spiegel von 15,38 vs. 2,03 mg/l.

Weiter zeigten Untersuchungen bei Patienten mit Nikotinkonsum eine vermehrte Urinausscheidung für Adrenalin, Dopamin und Noradrenalin (Benowitz et al., 1993). Adrenalin ist selbst nur ein schwacher Thrombozytenagonist, im Zusammenhang mit anderen Agonisten wird bei Patienten mit KHK die Aggregabilität von Thrombozyten allerdings deutlich erhöht (Hung et al., 1995). In einer weiteren Untersuchung konnten Benowitz et al. (1993) zeigen, dass Rauchen nicht nur zur Thromboxanbildung führt, sondern auch zu einer Thrombozytensekretion führt, mit einem Anstieg der Serumkonzentration von Plättchenfaktor 4 und  $\beta$ -Thromboglobulin.

#### 5.3.3.1 Beeinflussung der Plättchenaggregation durch die Therapie mit ASS bei Patienten mit Nikotinkonsum

Ikonomidis et al. (2005) zeigten für die Therapie mit ASS bei Rauchern, dass zwar die erhöhten proinflammatorischen Marker reduziert werden, aber die durch Rauchen entstehenden proinflammatorischen Effekte bei Patienten mit KHK nicht aufgehoben werden. Auch konnte er zeigen, dass die Relation von M-CSF zum  $\text{TxA}_2$  Metabolit konstant bleibt, sowohl für die Therapie bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern. Wie bereits unter 5.3.3 erwähnt, ist der Spiegel an M-CSF dreifach erhöht bei der Untersuchungsgruppe Raucher. Die Persistenz der Relation zwischen den  $\text{TxA}_2$  Metaboliten und M-CSF nach der Therapie mit ASS legt den Schluss nahe, dass das gemessene Thromboxan in reversiblen COX-1 oder COX-2 von Monocyten/Makrophagen gebildet wird (Neri et al., 1994) und dass die Therapie mit ASS keinen signifikanten Einfluss auf die Produktion von 11-dehydro-TxB durch COX-2 außerhalb der Thrombozyten hat.

Eine herabgesetzte Wirksamkeit für die Therapie mit ASS bei Rauchern findet sich auch in meinen Untersuchungen. Hier zeigte sich im t-Test für unabhängige Stichproben eine signifikante ( $p=0,026$ ) erhöhte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation für die Untersuchungsgruppe Nikotinkonsum plus ASS gegenüber der Gruppe kein Nikotinkonsum plus ASS. Für die gemessenen Mittelwerte zeigte sich ein Unterschied von 9,68  $\Omega$  vs. 6,63  $\Omega$ , was einer Erhöhung von 46% entspricht.

## **5.4 Einfluss der medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-System (RAS) auf die Plättchenaggregation**

### **5.4.1 Modulation der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer**

Als Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine signifikant reduzierte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation ( $p < 0,009$ ) unter der Therapie mit ACE-Hemmern, ausgewiesen durch eine geringere Impedanzzunahme ( $8,82 \pm 4,59 \Omega$ ) gegenüber der Amplitude des Normalkollektives ( $11,14 \pm 4,46 \Omega$ ), was einer Verminderung der Plättchenaggregation um 21% entspricht. Für die ADP-induzierte Plättchenaggregation konnte eine Reduktion der Plättchenaggregation um 25% gegenüber dem Normalkollektiv gezeigt werden, die aber nicht signifikant ist ( $p = 0,521$ ). Diese Ergebnisse basieren auf den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Prof. Bauriedel (Bauriedel et al., 2003; Skowasch et al., 2001). Diese Untersuchungen zeigen für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation eine Reduktion von 18% ( $p = 0,025$ ) und für die ADP-induzierte Plättchenaggregation eine Reduktion um 39% ( $p = 0,039$ ) gegenüber dem Normalkollektiv. Die Unterschiede resultieren aus der veränderten Fallzahl und den in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten Ausschlusskriterien Diabetes mellitus, Depression und Nikotinkonsum.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit werden durch Ergebnisse anderer Studien zur Modulation der Plättchenaggregation durch ACE-Hemmer gestützt. So zeigten James et al. (1988) und Someya et al. (1984) eine verminderte Plättchenaggregation für Hypertoniker unter Captopril-Therapie. Diese Messungen erfolgten jeweils an plättchenreichen Plasma, wohingegen die aktuellen Befunde mittels Vollblutaggregometrie ermittelt wurden, die durch die Präsenz verschiedener intrinsischer Blutkomponenten ein ungleich physiologischeres Milieu zur Messung der Thrombozytenfunktion gewährleistet (Nicholson et al., 1998) (Vergleich in 1.3).

#### **5.4.2 Modulation der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem AT1-Blocker**

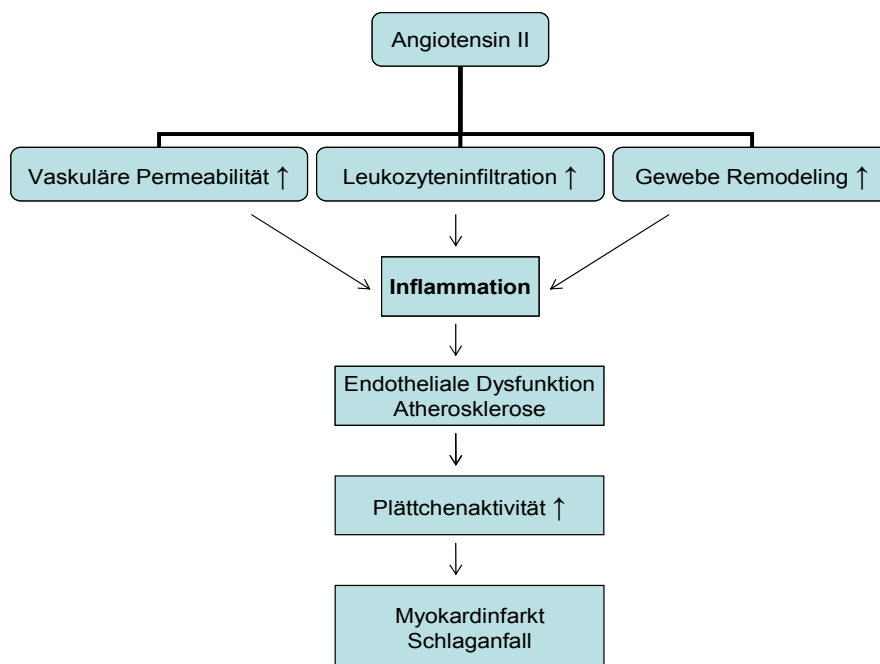
Als zentraler Befund der vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine signifikant reduzierte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation unter der Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten ( $p < 0,001$ ), ausgewiesen durch eine geringere Impedanzzunahme ( $7,45 \pm 3,22 \Omega$ ) gegenüber der Amplitude des Normalkollektives ( $11,14 \pm 4,46 \Omega$ ). Diese Ergebnisse demonstrieren eine verminderte Plättchenaggregation von 33% unter der Therapie mit AT1-Rezeptorantagonisten. Zwischen den beiden Wirkstoffen Losartan und Valsartan konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (siehe 4.6). Interessanterweise lag die Hemmung der Plättchenaggregation bei AT1-Blockertherapie in einer ähnlichen Größenordnung wie die Reduktion bei ASS als etabliertem Thrombozytenaggregationshemmer. Wie die Untersuchungen ausweisen, konnte ein signifikanter additiver Effekt bei kombinierter Gabe von ASS und AT1-Rezeptorantagonisten nicht nachgewiesen werden (siehe 4.5).

Die Befunde meiner Untersuchung werden durch Ergebnisse anderer Studien zur Modulation der Plättchenaggregation durch AT1-Rezeptorantagonisten gestützt. So zeigte Kraemer et al. (2002) für den AT1-Rezeptorantagonisten Losartan eine Reduktion der Plättchenaggregation durch seinen Metaboliten EXP3179 sowohl in vivo, als auch in vitro. Schieffer et al. (2004) zeigte für Irbesartan eine Reduktion der Thromboxan A<sub>2</sub>-induzierten Plättchenaggregation. Diese Untersuchungen erfolgten ebenfalls an plättchenreichem Plasma (siehe 5.4.1 und 1.3).

#### **5.4.3 Gemeinsame Diskussion der Modulation der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer und einem AT1-Blocker**

Unter Betrachtung der vorliegenden Befunde lässt sich eine Modulation der Plättchenaggregation durch das Renin-Angiotensin-System (RAS) vermuten. Es scheint besonders Angiotensin II (Ang II) neben seiner fördernden Wirkung auf Zellproliferation, Fibrosebildung und Produktion von Wachstumsfaktoren, auch über eine Monozytenaktivierung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Zytokinen einen Einfluss auf die Progression der Atherosklerose zu nehmen (Ruiz-Ortega et al., 2003, Schmidt-Ott et al., 2000).

So moduliert Ang II über eine erhöhte Gefäßpermeabilität (Suzuki et al., 2003), eine erhöhte Leukozyteninfiltration (Alvarez et al., 2004) und ein gesteigertes Gewebs-Remodeling (Johnson et al., 1992) die Entzündungsreaktion. Die bestehende Inflammation führt in der Folge zur endothelialen Dysfunktion und zur Progression der Atherosklerose. Dies führt zu einer vermehrten Plättchenaktivität mit der klinischen Manifestation eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls (Abb. 56).



**Abb. 56: Angriffspunkte der durch Ang II induzierten Inflammation**

Wie in Abb. 56 zu sehen, induziert Ang II eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Dies wird über eine gesteigerte Freisetzung von verschiedenen Eicosanoiden, wie Leukotriene  $C_4$  und Prostaglandinen  $E_2$  und  $I_2$  realisiert. Die Prostaglandine werden aus der Arachidonsäure über die Cyclooxygenase (COX) gebildet. Für die COX existieren zwei Isoformen, die COX-1 und COX-2. Das COX-1 Gen wird anders als das COX-2 Gen kontinuierlich exprimiert. Die Expression von COX-2 wird induziert durch Zytokine in verschiedenen Geweben (Breyer et al., 2001). Untersuchungen zeigen auch eine durch Ang II bedingte Up-Regulation der Expression von COX-2 mRNA in menschlichen Endothelzellen (Kramer et al., 2002) und bei Ratten in der Wand der Koronargefäße (Rocha et al., 2002). Es konnte auch eine Stimulation der Expression von COX-2 durch  $TNF-\alpha$  im humanen Myokard nachgewiesen werden (Wong et al., 1998). Es wird

angenommen, dass die durch Ang II bedingte Up-Regulation von COX-2 über AT1-Rezeptoren induziert wird (Ohnaka et al., 2000). Durch die Up-Regulation der COX-2 kommt es zu einer vermehrten Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub>, was die Thrombozytenaggregation fördert.

Im folgendem soll die durch Ang II-induzierte Leukozyteninfiltration angesprochen werden. Hierzu exprimieren die Leukozyten spezifische Adhäsions-Moleküle, die zur Familie der Selektine, der Immunglobuline und der Integrine gezählt werden. So konnten Studien eine erhöhte Expression von P-Selektin (Alvarez et al., 2004; Piqueras et al., 2000), E-Selektin (Grafe et al., 1997) durch eine Stimulation von Ang II zeigen. Für das L-Selektin wurde eine Down-Regulation nach Aktivierung mit Leukozyten in kardiovaskulären Patienten gefunden (Haught et al., 1996) sowie eine vermehrte Expression nach Behandlung mit einem selektiven AT1-Rezeptorantagonisten (Kranzhofer et al., 1999). In vitro-Studien konnten eine vermehrte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 durch Ang II im Gefäßendothel und in der glatten Muskulatur nachweisen (Pastore et al., 1999; Pueyo et al., 2000). Weiter konnte nach sechstägiger Infusion von Ang II eine direkte Stimulation der VCAM-1-mRNA-Expression und Proteinsynthese in der Rattenaorta beobachtet werden (Tummala et al., 1999), die durch die Gabe des AT1-Rezeptorantagonisten Losartan unterdrückt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Arbeiten von Alvarez et al. (2004) und Diep et al. (2002), die nach Infusion von Ang II eine vermehrte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in den Mesenterialarterien nachweisen konnten. Eine verstärkte Expression der Integrine durch Ang II konnte ebenfalls in mehreren Studien gezeigt werden. So zeigten Alvarez et al. (2004) eine erhöhte Expression von  $\beta_2$ - und  $\alpha_4$ -Integrin nach Infusion. Weiter konnte eine erhöhte Expression von  $\alpha_L\beta_2$ - und  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (korrespondierende Liganden für ICAM-1 und VCAM-1) (Mervaala et al., 1999) gezeigt werden. Die Überexpression von Integrinen durch Ang II konnte durch eine Langzeittherapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten vermindert werden (Mervaala et al., 1999; Muller et al., 2000). Nach der Bindung der Leukozyten an die Adhäsionsmoleküle, kommt es durch Ang II induzierte Produktion von Chemokinen und Zytokinen zur Transmigration in das Gewebe (Ruiz-Ortega et al., 2002). Hier scheint MCP-1 ein zentraler Mediator der durch Ang II induzierten Inflammation zu sein. So induziert Ang II die Bildung von MCP-1 im Gefäßendothel, in glatten Muskelzellen, in Monozyten/Makrophagen und in

kardialen Myozyten (Ni et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2000). MCP-1 induziert die Synthese von tissue factor durch die Thrombozyten (Schechter et al., 1996), was zu einer Steigerung der Thrombinsynthese und der Thrombozytenaggregation führt. Interessant erscheint hier die Studie von Ni et al. (2004), die nach Blockade von MCP-1, realisiert durch Ausschalten des MCP-1 Gens, eine reduzierte Progression und Destabilisierung von bestehenden atherosklerotischen Läsionen, sowie eine reduzierte Induktion von proinflammatorischen Genen bei Ratten nachweisen konnte. Eine weitere Studie zeigte bei Mäusen mit Myokardinfarkt eine erhöhte Überlebensrate nach Blockade von MCP-1 (Hayashidani et al., 2003). Es stellt sich hier die Frage, ob durch die Therapie mit ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptorantagonisten eine verminderte Expression von MCP-1 erreicht werden kann. Hierzu zeigen aktuelle Studien eine signifikante Reduktion von MCP-1 nach Therapie mit einem ACE-Hemmer oder einem AT1-Rezeptorantagonisten (Chen et al., 2001; Dol et al., 2001; Martin et al., 2004; Proudfoot et al., 2003). Auch die Zytokine IL-1, IL-6 (Han et al., 1999; Sano et al., 2000; Schieffer et al., 2000), IL-8 (Ito et al., 2002) und TNF- $\alpha$  (Ferrerri et al., 1997) zeigen bei erhöhten Spiegeln von Ang II eine erhöhte Expression (Brasier et al., 2002).

Es finden sich in den klinischen Studien, die kurz- bzw. langfristige Effekte von ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten auf Zytokine untersuchen, zeitabhängige Effekte. So konnte in einer Studie von Peeters et al. (1998) eine einmalige Gabe von Captopril oder Valsartan in therapeutischen Dosen bei Patienten mit essentieller Hypertonie keine Senkung der Konzentration von IL-6 und TNF- $\alpha$  bewirken. Auch in einer Studie von Lottermoser et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass sich nicht unmittelbar nach Infusion von Ang II oder durch eine einmalige Gabe von Valsartan die Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$ , IL-6 und VCAM-1 signifikant ändern lassen. Ebenfalls konnte die Studie keinen direkten Anstieg der Thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS), als Marker für oxidativen Stress, durch kurzfristiges Anheben der Plasmakonzentration von Ang II beobachten. Wurde die Therapie mit einem ACE-Hemmer oder einem AT1-Rezeptorantagonisten jedoch länger fortgesetzt, konnten hier Veränderungen der Entzündungsmediatoren gemessen werden. So konnte durch eine 14-wöchigen Therapie mit Candesartan ein erniedrigter Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1 und VCAM-1 erreicht werden (Tsutamoto et al., 2000). Auch unter der Therapie mit dem



ACE-Hemmer Lisinopril, konnte bei Patienten mit Herzinfarkt nach 12 bzw. 24 Wochen eine tendenzielle Abnahme von IL-6 beobachtet werden (Shet et al., 2002).

Auch meine Ergebnisse zur Verlaufsbeobachtung der Plättchenaggregation nach Verordnung des AT1-Rezeptorantagonisten Valsartan werden durch diese Beobachtungen gestützt. In der vorliegenden Studie (siehe 4.7) wurden 10 Patienten mit neu diagnostizierter essentieller Hypertonie mit Valsartan eingestellt. Die Plättchenaggregation wurde vor der ersten Einnahme und nach der ersten, zweiten und vierten Woche nach der Einnahme gemessen. Die Ergebnisse zeigen erst nach der vierten Woche eine signifikant reduzierte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation (36%,  $p=0,006$ ), ausgewiesen durch einem reduzierten Mittelwert für die Valsartan Therapie nach 28 Tagen von 7,35  $\Omega$  vs. 11,45  $\Omega$  für die Messung vor der Einnahme. Für die ADP-induzierte Plättchenaggregation konnte keine signifikante Veränderung im Verlauf gemessen werden.

Wie in der Abbildung 56 weiter zu sehen ist, kommt es durch Ang II zu einer Hypertrophie/Proliferation und Fibrosierung des Gewebes. So konnte beispielsweise an Ratten nach Infusion von Ang II eine besonders starke Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur in der Niere gezeigt werden (Johnson et al., 1999). Die Autoren verschiedener Studien machen hierfür Wachstumsfaktoren verantwortlich, die die Proliferation autokrin und parakrin induzieren. Es werden besonders die Faktoren bFGF (basic fibroblast growth factors), PDGF (platelet-derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) und TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) durch Ang II induziert (Chu et al., 1998; Otani et al., 1998; Wolf et al., 2004). PDGF steigert die Synthese von Thrombin-Rezeptoren in Gefäßwandmyozyten und wirkt so proaggregatorisch. Unter ACE-Hemmer-Therapie konnte eine Reduktion der Synthese von PDGF gezeigt werden (Wong et al., 1997). Darüber hinaus induziert Ang II die DNA-Synthese und die Proliferation von glatten Muskelzellen durch die Produktion von Sauerstoffradikalen, die die Expression und Aktivität von zellzyklusregulierenden Genen regulieren (Nickenig et al., 2002). Ein weiterer Mechanismus, der zu einer Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur führt, ist die induzierte Expression von vasoaktiven Substanzen wie Aldosteron und Endothelin. So induziert Ang II über AT1-Rezeptoren (Sung et al., 1994) die Expression von Endothelin-1 (ET-1) in der glatten Muskulatur und in den Endothelzellen (Crawford et al., 1994). ET-1 induziert eine vaskuläre

Inflammation und das Gewebe-Remodeling über einen erhöhten oxidativen Stress und über die Stimulation von IL-6, MCP-1 und NF- $\kappa$ B (Browatzki et al., 2000; Duerrschmidt et al., 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang, ist die durch Ang II induzierte Synthese von CTGF (connective tissue growth factor) (Finckenberg et al., 2003). Dieser Wachstumsfaktor führt zu einer verminderten Bildung von TGF- $\beta_1$ . Wie bereits unter 1.4 erwähnt, hemmt TGF- $\beta$  die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel und wirkt so antiinflammatorisch. In der Studie von Ruperez et al. (2003) konnte eine verminderte Expression von CTGF durch die Therapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten gezeigt werden.

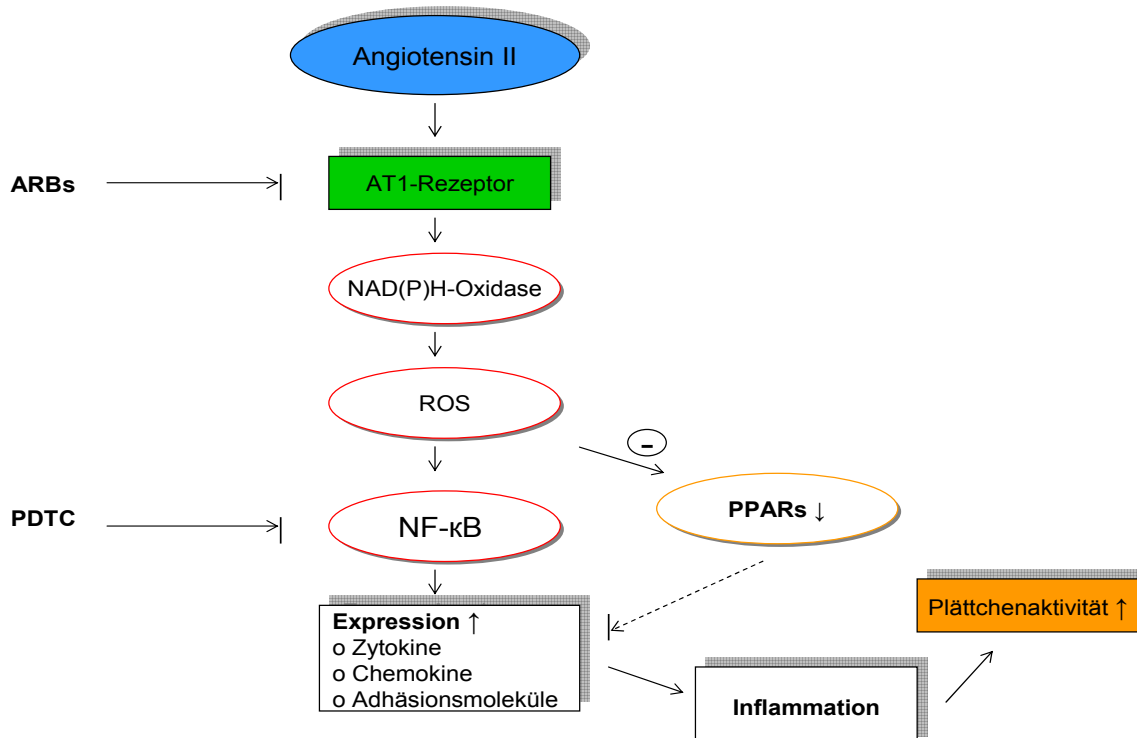
Ein weiterer wichtiger Mechanismus im Zusammenhang mit der Modulation der Plättchenaggregation, ist die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit bei Störung der Endothelfunktion (siehe 1.4.1). NO ist ein potenter Inhibitor der Aggregation und Adhäsion der Plättchen (Radomski et al., 1987). Es erhöht das cGMP und die Phosphorylierung des hemmenden Plättchenproteins VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Lamontagne et al., 1992; Pohl et al., 1994). Für die Kombinationstherapie mit einem Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten und einem ACE-Hemmer konnte ein Ansteigen der NO-Bioverfügbarkeit gezeigt werden (Bauersachs et al., 2002; Schäfer et al., 2003). Untersuchungen von Usui et al. (2000) zeigen, dass es durch die verminderte NO-Bioverfügbarkeit zu einer vermehrten Bildung von MCP-1 kommt. Auch dieser Mechanismus kann effektiv durch die Therapie mit Ang II-Antagonisten gehemmt werden (Luvara et al., 1998). Weiter konnte bei Patienten mit Herzinsuffizienz ein reduziertes Ansprechen der Plättchen auf NO beobachtet werden (Anderson et al., 2004), was durch die Therapie mit dem ACE-Hemmer Perindopril verbessert werden konnte (Chirkov et al., 2004).

Im Bezug zur Modulation der Plättchenaggregation ist der durch Ang II induzierte oxidative Stress ein weiterer wichtiger Mechanismus. So konnten Usui et al. (2002) eine durch Ang II induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nachweisen, die über den AT1-Rezeptor die proinflammatorischen Gene wie das VCAM-1 induzieren. Für die Bildung von ROS werden besonders NAD(P)H-Oxidasen verantwortlich gemacht (Griendling et al., 2000). Ang II induziert die Bildung von NAD(P)H-Oxidasen (Warnholtz et al., 1999) durch die AT1-Rezeptor-abhängigen Phospholipase D-, Proteinkinase C- und Rac-Signal-Kaskaden (Mollnau et al., 2002; Seshiah et al., 2002). Durch Blockade

der Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen durch AT1-Rezeptorantagonisten und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Dechend et al., 2001), sowie die Neutralisation von gebildetem  $O_2^-$  durch Antioxidantien (Mervaala et al., 2003), kommt es zu einer Erniedrigung des Blutdrucks und zur Reduktion der Inflammation. Weiter kommt es durch die Bildung von Sauerstoffradikalen zu einer Steigerung der tissue factor-Synthese. Tissue factor ist ein Initiator der Gerinnungskaskade und führt zur Bildung von Thrombin (Sato et al., 1996). Thrombin ist ein starker Plättchenagonist und trägt zur Rekrutierung von Thrombozyten bei (siehe 1.2.3). Es konnte in einer in vitro-Studie eine Inhibition der tissue factor-Expression durch die Gabe von Enalapril gezeigt werden (Lindmark et al., 2002; Nagata et al., 2001).

Für die Regulation der durch Ang II induzierten Expression und Produktion der verschiedenen Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B verantwortlich gemacht (siehe hierzu die Abb. 57). So konnte in vitro-Studien eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B in Abhängigkeit von Ang II in der glatten Gefäßmuskulatur, im Endothel, sowie in glomerulären und tubulären Zellen nachgewiesen werden (Kiarash et al., 2001; Kranzhöfer et al., 1999; Ruiz-Ortega et al., 2001). In einer Studie von Muller et al. (2001) konnte die Induktion von NF- $\kappa$ B durch Ang II auch an Ratten gezeigt werden. Hier kam es nach Infusion von Ang II zu einer erhöhten Aktivität und Expression des Transkriptionsfaktors in den Gefäßen, Herz und Niere. Die durch Ang II induzierte Expression von NF- $\kappa$ B wird über die AT1-Rezeptoren gesteuert (Muller et al., 2000). Neuere Untersuchungen zeigen eine durch Ang II induzierte Synthese von Metalloproteinasen (MMP) via NF- $\kappa$ B und Aktivator Protein-1 (AP-1) in der glatten Gefäßmuskulatur (Browatzki et al., 2005). MMPs können durch ihre Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu verdauen, zu einer Schwächung oder Ruptur von Plaques führen (Libby et al., 1995). Es konnte eine reduzierte Expression von MMPs im Myokard unter Therapie mit Ramipril (Seeland et al., 2002), in der Aorta von Kaninchen unter Therapie mit Losartan (Chen et al., 2002) und in humanen Karotiden-Plaques unter Therapie mit Irbesartan (Cippolone et al., 2004) gezeigt werden. So kommt es durch die Inhibition des RAS zu einer Stabilisierung der Plaques, was unter anderen ein Faktor für eine reduzierte Plättchaggregation sein kann. Weitere wichtige Aktivatoren von NF- $\kappa$ B sind IL-1 $\beta$ , ROS und die ASS-sensitiven Enzyme des Arachidonsäure Metabolismus (Constanzo et al., 2003; Jiang et al., 2004). Die Therapie des

Transkriptionsfaktors, als zentraler Mechanismus der Inflammation, erscheint als besonders wichtiger Angriffspunkt einer kausalen Therapie. So konnte unter der Therapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten eine verminderte Expression von NF- $\kappa$ B gezeigt werden (Dandona et al., 2003; Ruiz-Ortega et al., 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist der PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), mit seinen günstigen Effekte auf die Inflammation (Collin et al., 2004). Es wird von einigen Autoren vermutet, dass die anti-inflammatorischen Effekte von PPARs teilweise durch eine Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalzyklus zu erklären sind (Marx et al., 1999; Staels et al., 1998). So konnte unter der Gabe von PPAR-Agonisten eine verminderte Transkription von proinflammatorischen Genen wie z. B. für Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Metalloproteinasen, sowie eine verminderte Rekrutierung von Lymphozyten und Makrophagen in Gefäßwänden beobachtet werden. (Tham et al., 2003). Umgekehrt kommt es durch einen hohen Plasmaspiegel zur Down-Regulierung der PPARs und somit zu einer erhöhten inflammatorischen Antwort (Tham et al., 2002).



**Abb. 57: Rolle von NF- $\kappa$ B für die durch Ang II induzierte Inflammation**

ARBs (angiotensin receptor blockers); PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate)

Im Zusammenhang mit der Besprechung des RAS wird oft auch die Substanz Bradykinin genannt. Der gestörte Abbau des Bradykinins unter ACE-Hemmer Therapie wird für den entstehenden Reizhusten verantwortlich gemacht. Etwa jeder zehnte Patient mit ACE-Hemmer Therapie zeigt diese Unverträglichkeit (Bart et al., 1999), die einen Wechsel zu einem selektiven AT1-Rezeptorantagonist erfordert. Die biologischen Effekte von Bradykinin werden über die B1- und B2-Rezeptoren vermittelt. So werden die antiproliferativen, antioxidierenden und antithrombotischen Effekte über die B2-Rezeptoren induziert (Coelho et al., 1997; Gohlke et al., 1994). Die Therapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten führt zu einer verstärkten Stimulation der AT2-Rezeptoren, diese aktivieren dann B2-Rezeptoren, was zu einer verstärkten NO-Freisetzung führt (Cervenka et al., 2003). Die Effekte der B1 Rezeptoren sind nur zum Teil geklärt. In einer Studie von Schanstra et al. (2000) konnte in Ratten eine erhöhte Expression von B1-Rezeptoren durch eine induzierte Inflammation gezeigt werden. Es wird eine Aktivierung der B1-Rezeptoren durch Ang II über die AT1-Rezeptoren angenommen (Kintsurashvili et al., 2001).

Ein weiterer wichtiger Punkt im Zusammenhang mit der Modulation der Plättchenaggregation ist der direkte Einfluss von Ang II auf die Thrombozyten. Es berichten zahlreiche Studien, dass die Thrombozyten neben ihrer Funktion bei der Hämostase, auch eine inflammatorischen Antwort modulieren können. So konnte gezeigt werden, dass es durch die Bindung von Thrombin an seinen Rezeptor am Endothel zu einer induzierten Expression von P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 kommt (Strukova, 2001). Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche AT1-Rezeptoren (Crabos et al., 1993; López-Farré et al., 2001). Welchen Einfluss diese Rezeptoren für Plättchenaggregation haben, ist bisher unbekannt. Die Studie von Schwemmer et al. (2001) zeigt an gewaschenen Plättchen von Hunden eine dosisabhängige Suppression der Thrombin induzierten Freisetzung von  $\text{TxA}_2$  durch eine Hemmung des  $\text{TxA}_2$ -PGH<sub>2</sub>-Rezeptor unter Losartan-Therapie. Auch die Studie von Antonio López-Farré et al. (2001) zeigt in einer in vitro Studie eine Hemmung der  $\text{TxA}_2$ -Rezeptoren durch Losartan und Irbesartan und somit eine Inhibition der  $\text{TxA}_2$ -Plättchenaggregation. Hier konnte eine Inhibition nur für die Konzentration von  $5 \cdot 10^{-7}$  mol gezeigt werden. Diese Konzentration ist deutlich höher als die Blut-Konzentration ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol) von Patienten unter Therapie mit Losartan. Diese Studien stützen die

vorliegende in-vitro Messreihe mit der Rohsubstanz Valsartan. Die von mir durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das Zuführen von therapeutischen Dosen zu keiner signifikanten Modulation der Plättchenaggregation führt (siehe 4.8). Es konnte nur eine Beeinflussung der Plättchenaggregation durch eine unphysiologische Dosis von 100 mg/L gefunden werden. Diese Dosis entspricht der 100fachen Menge, die nötig ist um die AT1-Rezeptoren vollständig zu blockieren.

Das verdeutlicht nochmals, dass eine Vielzahl an Zellen, wie Neutrophile, Monozyten und Endothelzellen, an der Regulation der Plättchenaktivität beteiligt sind und dass die Modulation der Plättchenaggregation durch das RAS als ein multifaktorielles Ereignis aufgefasst werden muss.

#### **5.4.4 Unterschiede zwischen der Therapie mit einem ACE-Hemmer und einem AT1-Blocker**

Ein Vergleich der Plättchenaggregation von Patienten mit ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten Therapie (siehe 4.4 und 4.5) zeigt allenfalls einen Trend ( $p=0,116$ ) für eine stärkere Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation unter der Therapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten, ausgewiesen durch eine geringere Impedanzzunahme ( $7,57 \pm 3,22 \Omega$ ) gegenüber der Amplitude des mit einem ACE-Hemmer therapierten Kollektives ( $8,82 \pm 4,59 \Omega$ ), was einer Verminderung der Plättchenaggregation um 14% entspricht. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Untersuchungen von Schieffer et al. (2004), der die TxA<sub>2</sub>-induzierte Plättchenaggregation von Patienten mit Einnahme von 300 mg Irbesartan und 20 mg Enalapril verglichen hat. Er zeigte für die Untersuchungsgruppe Irbesartan eine signifikante ( $p<0,001$ ) Reduktion der Plättchenaggregation gegenüber der Untersuchungsgruppe Enalapril. Die untersuchten Blutproben stammten von Patienten mit Zustand nach koronarer Angioplastie und angiographisch dokumentierter KHK. Weiter zeigte er eine stärkere Reduktion des Plasmaspiegels von IL-6 in der Untersuchungsgruppe mit Irbesartantherapie. Dieser unterschiedliche Plasmaspiegel von IL-6 könnte verantwortlich sein für die Höhe der Reduktion der Plättchenaggregation. IL-6 fördert neben der B-Zell-Differenzierung die Synthese von Akute-Phase Proteinen, die Proliferation von glatten Muskelzellen, die Freisetzung von Metalloproteinasen und die Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und

von TNF- $\alpha$  (Heinrich et al., 1998). Die Spiegel von IL-6 sind erhöht bei Patienten mit schwerer KHK und bei Patienten mit instabiler Angina (Biasucci et al., 1996, 1999). Dies könnte auch der Grund sein, weshalb die vorliegende Arbeit mit Untersuchungen an schwächer erkrankten Patienten, einen geringer ausgeprägten Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten zeigen.

Ein weiterer Mechanismus, der das unterschiedliche Ansprechen miterklärt, könnte das unter der Therapie mit einem ACE-Hemmer beobachtete Escape-Phänomen sein. Wie bereits unter 1.5.1 erwähnt, wird etwa 40% des Ang II unabhängig vom ACE gebildet. Dies verdeutlicht das schlechtere Ansprechen der Therapie mit einem ACE-Hemmer auf die durch Ang II induzierte Inflammation und damit indirekt auf die Plättchenaggregation. Eine weitere Ursache ist die durch die Therapie mit einem AT1-Rezeptorantagonisten verstärkte Stimulation der AT2-Rezeptoren, die zu einer verstärkten Aktivierung der B2-Rezeptoren führen. Die aktivierten B2-Rezeptoren vermitteln antiproliferative, antioxidierende und antithrombotische Effekte (siehe 5.1.3).

#### **5.4.5 Beeinflussung der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer und AT1-Blocker bei Diabetikern**

Vor dem Hintergrund der unter 5.3.1.1 beschriebenen „ASS-Resistenz“ wurde die Plättchenaggregation von Diabetikern untersucht, die eine Therapie mit einem ACE-Hemmer oder AT1-Antagonisten, aber nicht mit ASS oder Clopidogrel erhalten (siehe 4.9). Es zeigte sich hier eine signifikante Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation unter ACE-Hemmer ( $p=0,022$ ) und unter AT1-Rezeptorantagonisten ( $p<0.001$ ) Therapie gegenüber dem Diabetes-Kollektiv. Im Vergleich zur Therapie mit ASS zeigt sich in einer Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni eine signifikante Reduktion der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation in der Untersuchungsgruppe mit AT1-Rezeptorantagonisten. Dies entspricht einer Reduktion des Mittelwertes um 43% für die Kollagen- und um 77% für die ADP-induzierte Plättchenaggregation gegenüber der Therapie mit ASS (siehe 4.9.2). Für die Therapie mit einem ACE-Hemmer konnte im t-Test für unabhängige Stichproben eine Signifikanz für die ADP-induzierte Plättchenaggregation und ein Trend für die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation gegenüber der Therapie mit ASS gezeigt werden.

Ausgedrückt in einer prozentualen Veränderung, bedeutet dies eine Reduktion des Mittelwertes von 16% für die Kollagen- und von 51% für die ADP-induzierte Plättchenaggregation gegenüber der Therapie mit ASS (siehe 4.9.1). Diese Ergebnisse zeigen eine günstige Modulation der Plättchenaggregation von Diabetikern durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonisten. Weiter zeigen diese Daten einen möglichen Benefit der Beeinflussung der Plättchenaggregation durch ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten gegenüber der Therapie mit ASS. Grund hierfür könnte die multifaktorielle Beeinflussung der Plättchenaggregation bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten sein, die durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorantagonisten günstig beeinflusst werden. So kann durch die therapeutische Beeinflussung des RAS (siehe 5.4.3) die durch Diabetes mellitus erhöhte Produktion von Thromboxan A<sub>2</sub>, tissue factor, Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Chemokinen, sowie die erhöhte Expression von COX-2 günstig beeinflusst werden. Gleichzeitig kann der oxidative Stress mit einer erhöhten NAD(P)H Synthese und einer verminderten NO-Produktion reduziert werden. Die erhöhte Expression von MCP-1 und die Synthese von Endothelin-1 und asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) (Delles et al., 2002) wird ebenfalls unter der Therapie mit einem ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonisten reduziert. Inwieweit die Kombinationstherapie aus ASS und einem ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonist bei Diabetikern weitere Vorteile für die Modulation der Plättchenaggregation bringt, wird in einer aktuell laufenden Studie in der Arbeitsgruppe Prof. Bauriedel geprüft.

#### **5.4.6 Beeinflussung der Plättchenaggregation durch die Therapie mit einem ACE-Hemmer bei Patienten mit Nikotinkonsum**

Als Ergebnis meiner Untersuchung zeigt sich eine signifikant reduzierte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation ( $p=0,022$ ) für die Untersuchungsgruppe Nikotinkonsum plus ACE-Hemmern, ausgewiesen durch eine geringere Impedanzzunahme ( $9,67 \pm 4,7 \Omega$ ) gegenüber der Amplitude der Untersuchungsgruppe Nikotinkonsum ohne antithrombotische Medikation ( $13,72 \pm 4,23 \Omega$ ), was einer Verminderung der Plättchenaggregation um 30% entspricht. Diese hier bestimmte prozentuale Reduktion der Plättchenaggregation ist stärker als die, die bei Patienten ohne Nikotinkonsum gemessen wurde (siehe 4.4 und 4.10). Weiter zeigt sich, dass die Mittelwerte der



Kollagen-induzierten Plättchenaggregation in den Untersuchungsgruppen Nikotinkonsum plus ACE-Hemmer und Nikotinkonsum plus ASS nahezu identisch sind (9,67  $\Omega$  vs. 9,68  $\Omega$ ). Da die erhöhte Plättchenaggregation bei Patienten mit Nikotinkonsum u. a. auf eine Erhöhung der Inflammation zurückzuführen ist (siehe 5.3.3), kann diese hier gemessene Reduktion der Plättchenaggregation nochmals als Indiz für eine antiinflammatorische Wirkung der ACE-Hemmer gewertet werden.

## 6 Zusammenfassung

Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Hemmer und Angiotensin 1-Rezeptorblocker (ARBs) sind Eckpfeiler in der Therapie kardiovaskulärer Patienten. In mehreren randomisierten und Placebo kontrollierten Studien konnte eine signifikante Verminderung von kardiovaskulärer Mortalität, Myokardinfarkt und Schlaganfall nachgewiesen werden (Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity (CHARM), The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators (HOPE), Losartan Intervention For Endpoint reduction in Hypertension (LIFE), Valsartan in Acute Myocardial Infarction (VALIANT)). Vor diesem Hintergrund untersucht diese Studie die antithrombozytären Effekte von ACE-Hemmern und ARBs, die durch Prophylaxe von Plaqueruptur und konsekutiven Thrombosen die Reduktion von kardiovaskulären Endpunkten und Progression atherosklerotischer Organleiden miterklären könnten. Hierzu vergleicht die Studie die koagulatorische Aktivität von ARBs mit der unter ACE-Hemmer Therapie, ASS-Monotherapie, ASS/Clopidogrel-Therapie und einem Kollektiv unbehandelter Patienten. Weiter untersucht die Studie die Plättchenaggregation von Patienten mit den kardiovaskulären Risikofaktoren Nikotinkonsum, Depression und Diabetes mellitus. Es wurden Proben von insgesamt 598 Patienten mit koronarer Herzerkrankung und/oder arterieller Hypertonie mittels Vollblutaggregometrie analysiert. Dabei wurde die Agonisten-induzierte Plättchenaggregation (Adenosindiphosphat, Kollagen) durch die Zunahme der Impedanz (Ohm) quantifiziert. Die Daten wurden mit Vorliegen bzw. Fehlen der Medikation korreliert.

Nachfolgend werden die Eingangsfragen (siehe unter 2) der vorliegenden Promotionsschrift wie folgt spezifisch beantwortet: **1.)** Die vorliegende Untersuchung zeigt eine signifikante Korrelation zwischen der Plättchenaggregation und der Thrombozytenzahl. Für die Laborparameter CRP, PTT, Quick, INR, Kreatinin, LDL, HDL, Cholesterin, und Triglyceride konnte keine signifikante Beeinflussung der Plättchenaggregation gezeigt werden. Dagegen war eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation nachweisbar ( $p=0,008$ ). Für das Geschlecht, den Vergleich zwischen Vene und Arterie und für die medikamentöse Therapie mit  $\beta$ -Blockern,  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten, Nitraten, CSE-Hemmern, Digitalis, Diuretika, Vitamin-K-Antagonisten und Heparin, konnte keine signifiante Beeinflussung der Kollagen- und ADP-induzierten Plättchenaggregation gezeigt werden. **2.)** Die Untersuchung der Plättchenaggregation von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren ergab eine erhöhte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation für das Patientenkollektiv Diabetes mellitus (26%,  $p=0,028$ ) und Nikotinkonsum (23%,  $p=0,006$ ) im Vergleich zum Normalkollektiv. Für die Untersuchungsgruppe Depression, zeigte sich im Vergleich mit dem Normalkollektiv eine

erhöhte ADP-induzierte Plättchenaggregation (58%,  $p=0,004$ ). **3.)** Bei Patienten mit Diabetes mellitus und Nikotinkonsum zeigte sich ein schlechteres Ansprechen auf die Therapie mit ASS, ausgedrückt in einer signifikant erhöhten Kollagen-induzierten Plättchenaggregation für die Patienten mit ASS-Therapie und Diabetes mellitus (75%,  $p<0,001$ ) oder Nikotinkonsum (46%,  $p=0,026$ ). **4.)** Als zentraler Befund der vorliegenden Untersuchungen zeigt sich eine verminderte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation bei den Studienteilnehmern mit ARBs, ACE-Hemmern und ASS. Die Plättchenaggregation wurde unter der Therapie mit ARBs (33%,  $p<0,001$ ), ACE-Hemmer (21%,  $p=0,009$ ) und mit ASS (40%,  $p<0,001$ ) signifikant reduziert. Für die ADP-induzierte Plättchenaggregation zeigte sich eine signifikante Reduktion der Plättchenaggregation unter der Therapie mit ASS/Clopidogrel (89%,  $p=0,024$ ). Die Therapie mit einem ARB (27%,  $p=0,449$ ) und mit einem ACE-Hemmer (25%,  $p=0,521$ ) zeigte keine signifikante Reduktion der ADP-induzierten Plättchenaggregation. **5.)** Die Verlaufsbeobachtung nach Neueinstellung mit Valsartan zeigte nach 28 Tagen eine signifikant reduzierte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation (36%,  $p=0,006$ ). **6.)** In einer in vitro-Messreihe zur Testung der möglichen Modulation der Plättchenaggregation durch die Rohsubstanz Valsartan konnte für äquivalente therapeutische Dosen sowohl für die Kollagen- wie für die ADP-induzierte Plättchenaggregation keine signifikante Beeinflussung gezeigt werden. Es konnte nur für unphysiologische Dosierungen von 100mg/l eine Beeinflussung beobachtet werden. **7.)** Der Vergleich der Plättchenaggregation von Patienten mit ACE-Hemmer oder AT1-Blocker Therapie zeigt allenfalls einen Trend für eine stärkere Reduktion der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation unter der Therapie mit einem AT1-Blocker (14%,  $p=0,116$ ). **8.)** Es zeigte sich für Patienten mit Diabetes mellitus und Therapie mit einem ARB eine signifikante Reduktion der Kollagen-induzierten (43%,  $p=0,041$ ) und der ADP-induzierten Plättchenaggregation (77%,  $p=0,005$ ) im Vergleich zur Therapie mit ASS. Für die Therapie mit einem ACE-Hemmer konnte keine signifikante Reduktion im Vergleich zur Therapie mit ASS nachgewiesen werden. **9.)** Die Therapie mit einem ACE-Hemmer bei Patienten mit Nikotinkonsum, zeigt eine signifikant reduzierte Kollagen-induzierte Plättchenaggregation (30%,  $p=0,022$ ).

Zusammenfassend führt die Therapie mit ACE-Hemmern und AT1-Rezeptorantagonisten zu einer signifikanten Verminderung der Plättchenaggregation ex vivo. Das antithrombotische Potential der ACE-Hemmer und ARB könnte für die Reduktion der konsekutiven Thrombosen und der Progression atherosklerotischer Organleiden mitverantwortlich sein und so die Reduktion kardiovaskulärer Endpunkte miterklären. Die Therapie mit einem ACE-Hemmer oder ARB zeigt eine günstige Modulation der Plättchenaggregation bei Patienten mit Diabetes mellitus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbate R, Favilla S, Boddi M, Costanzo G, Prisco D. Factors influencing platelet aggregation in whole blood. *Am J Clin Pathol* 1986; 86:91-96
- Agelink MW, Baumann B, Sanner D, Kavuk I, Mueck-Weymann M. Komorbidität zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Depressionen. *Dtsch Med Wschr* 2004; 129:697-700
- Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu NY et al.. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 2004; 104:402-408
- American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27:5-10
- Anand SS, Yusuf S. Oral anticoagulant therapy in patients with coronary artery disease: a meta-analysis. *JAMA* 1999; 282:2058-2067
- Anderson RA, Ellis GR, Chirkov YY et al.. Determinants of platelet responsiveness to nitric oxide in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2004; 6:47-54
- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta- analysis. *Diabetes Care* 2001; 24:1069-1078
- Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:91-105
- Anfossi G, Trovati M. Role of catecholamines in platelet function: pathophysiological and clinical significance. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:353-370
- Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308:81-106
- Ariyo AA, Haan M, Tangen CM et al.. Depressive symptoms and risk of coronary heart disease and mortality in elderly Americans. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *Circulation* 2000; 102:1773-1779
- Aromaa A, Raitasalo R, Reunanen A et al.. Depression and cardiovascular diseases. *Acta Psychiatr Scand* 1994; 377:77-82
- Assert R, Scherk G, Bumbure A, Pirags V, Schatz H, Pfeiffer AF. Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro. *Diabetologia* 2001; 44:188-195
- Assmann G, Gotto AM. HDL-cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109:8-14
- Bader M, Peters J, Baltatu O et al.. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79:76-102
- Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaei S, Rett K, Haring HU. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000; 101:1780-1784
- Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Lehn-Stefan A, Overkamp D, Dietz K, Haring HU. Insulin resistant young subjects at risk of accelerated atherosclerosis exhibit a marked reduction in peripheral endothelial function early in life but not differences in intima-media thickness. *Atherosclerosis* 2003; 348:383-393.

Bart BA, Ertl G, Held P, Kuch J, Maggioni AP, McMurray J, Michelson EL, Rouleau JL, Warner Stevenson L, Swedberg K, Young JB, Yusuf S, Sellers MA, Granger CB, Califf RM, Pfeffer MA. Contemporary management of patients with left ventricular systolic dysfunction. Results from the Study of Patients Intolerant of Converting Enzyme Inhibitors (SPICE) Registry. *Eur Heart J* 1999; 20:1182-1190

Basta G, Schmidt AM, de Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implication for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Card Vas Res* 2004; 63:582-592

Bataille R, Klein B. C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin 6 levels in humans in vivo. *Arthritis Reum* 1992; 35:982-984

Bauer J, Ganter U, Geiger T, et al.. Regulation of interleukin 6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte derived macrophages. *Blood* 1988; 72:1134-1140

Bauersachs J, Heck M, Fraccarollo D et al.. Addition of spironolactone to ACE inhibitor in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial NO synthase expression. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:351-358

Bauersachs J, Schäfer A. Endothelial dysfunction in heart failure. Mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2:115-124

Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Lüderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999; 41:480-488

Bauriedel G, Skowasch D, Schneider M, Andrié R, Jabs A, Lüderitz B. Antiplatelet effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors compared with aspirin and clopidogrel: a pilot study with whole-blood aggregometry. *Am Heart J* 2003; 145:343-348

Becker A, Bos G, de Vegt F, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Cardiovascular events in type 2 diabetes: comparison with nondiabetic individuals without and with prior cardiovascular disease. 10-year follow up of the Hoorn-Study. *Eur Heart J* 2003; 24:1406-1413

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology and management. *JAMA* 2002; 287:2570-2581

Benowitz NL, Fitzgerald GA, Wilson M, Zhang Q. Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *J AM Coll Cardiol* 1993; 22:1159-1167

Berkels R, Klaus W. Kalziumantagonisten näher betrachtet. *Dtsch Med Wschr* 2000; 17:531-533

Bervers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Changes in membrane phospholipids distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta* 1983; 736:57-66

Bervers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Mechanisms involved in platelet procoagulant response. *Adv Exp Med Biol* 1993; 344:195-207

Bhatt DL, Marso SP, Hirsch AT, Ringleb PA, Hack W, Topol EJ. Amplified benefit of clopidogrel versus aspirin in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002; 90:625-628

Biasucci L, Vitelli A, Liuzzo G et al.. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94:874-877

Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Ginneti F, Dinarello CA, Maseri A. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation* 1999; 99:2079-2084

- Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL et al.. Elevated level of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99:855-860
- Börger RH. Asymmetrische Dimethylarginin als kardiovaskulärer Risikofaktor. *Dtsch Med Wschr* 2004; 129:820-824
- Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194:927-929
- Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168:178-195
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappaB is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97:1715-1722
- Brasier AR, Recinos A III, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1257-1266
- Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir JF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 98:283-298
- Bretschneider E, Glusa E, Schrör K. ADP-, PAF- and adrenaline-induced platelet aggregation and thromboxane formation are not affected by a thromboxane receptor antagonist at physiological  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Thromb Res* 1994; 75:233-242
- Breyer MD, Harris RC: Cyclooxygenase 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:89-98
- Bridges JM, Dalby AM, Milliar JH, Weaver JA. An effect of d-glucose on platelet stickiness. *Lancet* 1965; 42:75-77
- Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, Kranzhofer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2000; 95:98-105
- Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CAH, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhöfer A, Katus HA, Kranzhöfer R. Angiotensin II Stimulates Matrix Metalloproteinase Secretion in Human Vascular Smooth Muscle Cells via Nuclear Factor- $\kappa$ B and Activator Protein 1 in a Redox-Sensitive Manner. *J Vasc Res* 2005; 42:415-423
- Browbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G. Influence of platelet count and activity on thromboelastography parameters. *Platelets* 2003; 14:219-224
- Caldwell PRB, Seegal BC, Hsu KC, Das M, Soffer RL. Angiotensin converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 1976; 191:1050-1051
- Cambien F, Poirier O, Lecerf L. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359:641-644
- Campbell DJ, Bouhnik J, Menard J, Corvol P. Identity of angiotensinogen precursors in rat brain and liver. *Nature* 1984; 308:206-208
- Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissue of the rat. *J Clin Invest* 1986; 78:31-39
- Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987; 79:1-6
- CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348:1329-1339

Cardinal DC and Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J Pharmacol Meth* 1980; 3(135):158

Carney RM, Blumenthal JA, Stein PK et al.. Depression, heart rate variability, and acut myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104:2024-2028

Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. *J Diabetes Complications* 2001; 15:44-54

Cassis LA, Saye JA, Peach MJ. Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 1988; 11:591-596

Ceriello A, Motz E. Prevention of vacular events in dabetes mellitus: Which "antithrombotic" therapy? *Diabetologia* 1996; 39:1405-1406

Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hyothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:816-823

Cervenka L, Vaneckova I, Maly J et al.. Genetic inactivation of the B2 receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension. Role of NO and the AT2 receptor. *J Hypertens* 2003; 21:1531-1538

Chai SY, McKinley MJ, Mendelsohn FAO. Distribution of angiotensin converting enzyme in sheep hypothalamus and medulla oblongata visualized by in vitro autoradiography. *Clin Exper Theory and Practise* 1987; 9:449-460

Challen A, Branch WJ, Cummingy JH. Quantitation of platelet mass during aggregation in the electronic whole blood aggregometer. *Jnl of Pharmac Meth* 1982; 8:115-122

Charo IF, Kiefer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practise*. 3 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott 1994; 489-507.

Chen H, Li D, Mehta JL. Modulation of matrix metalloproteinase-1, its tissue inhibitor, and nuclear factor-kappa B by Losartan in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39:332-339

Chen HJ, Li DY, Saldeen T et al.. Attenuation of tissue P-selectin and MCP-1 expression and intimal proliferation by AT(1) receptor blockade in hyperlipidemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282:474-479

Chirkov YY, Holmes AS, Martelli JD, Horowitz JD. Effect of perindopril on platelet nitric oxide resistance in patients with chronic heart failure secondary to ischemic left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 2004; 93:1438-1440

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1401:187-194

Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Zucchelli M, de Cesare D, Uchino S, Spigonardo F, De Luca M, Muraro R, Bei R, Bucci M, Cuccurullo F, Mezzetti A. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent matrix metallo-proteinase activity. *Circulation* 2004; 109:1482-1488

Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Ischaemic Events (CURE). *N Engl J Med* 2001; 345:494-502

Clouse RE, Lustman PJ, Feedland KE, Griffith LS, McGill JB, Carney RM. Depression and coronary heart disease in women with diabetes. *Psychosom Med* 2003; 65:376-383

Coelho MM, Oliveira CR, Pajolla GP et al.. Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. *Br J Pharmacol* 1997; 121:296-302

Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324:71-86

Coller BS, Gralnick HR. The effect of stir bar size and shape on quantitative platelet aggregation. *Thromb Res* 1976; 8:121-129.

Collin M, Patel NS, Dugo L, Thiernemann C. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-deoxydelta 12, 14 prostaglandin J2 against the multiple organ failure caused by endotoxin. *Crit Care Med* 2004; 32:826-831

Consentino F, Eto M, de Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Gatti CD, Joch H, Volpe M, Lüscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase 2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells. *Circulation* 2003; 107:1017-1023

Constanzo A, Moretti F, Burgio VL et al.. Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol* 2003; 195:402-410

Coyne KS, Lundergan CF, Boyle D et al.. Relationship of infarct artery patency and left ventricular ejection fraction to health-related quality of life after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 124:1245-1251

Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res* 1994; 74:727-739

Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108:1527-1532

Criscione L, de Gasparo M, Buehlmyer P, Whitebread S, Ramjouw HP, Wood JM. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the Ang II AT1-receptor subtype. *Br J Pharmacol* 1993; 110:761-771

Criscione L, Bradley WA, Buehlmyer P, Whitebread S, Glazer R, Lloyd P, Mueller P, de Gasparo M. Valsartan, Preclinical and clinical profile of an antihypertensive angiotensin-II antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 1995; 13:230-250

Cullen P, Assmann G. Primäre und sekundäre Prävention der koronaren Herzkrankheit. Ein Positionspapier der International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. *Dtsch Med Wschr* 2000; 125:881-887

Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791

Dahlöf B et al.. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002; 359:995-1003

Dandona P, Kumar V, Aljada A et al.. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects. Evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4496-4501

Davi G, Catalano I, Aversa M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattini G, et al.. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 322:1769-1774

Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53:363-373



De Caterina R. Nitrates as thrombocyte function inhibitors. *Z Kardiol* 1994; 83:463-473

Dechend R, Fiebeler A, Lindschau C et al.. Modulating angiotensin II-induced inflammation by HMG Co-A reductase inhibition. *Am J Hypertens* 2001; 14:55-61

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T et al.. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52:415-472

De Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990; 75:308-312

Delles C, Schneider MP, John S. Angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II AT-1-receptor blockade reduce the levels of asymmetric N(G), N(G)-dimethyl-arginine in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15:590-593

de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-785

Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS et al.. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma. *Circulation* 2002; 105:2296-2302

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci* 2001; 100:481-492

Dol F, Martin G, Staels B et al.. Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38:395-405

Duerrschrnmidt N, Wippich N, Goettsch W et al.. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269:713-717

Eberth JC, Schimmelbusch C. Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. *Virchow's Archiv* 1886; 105:331-350

Eberth JC, Schimmelbusch C. Die Thrombose nach Versuchen und Leichenbefunden. Stuttgart: Ferdinand Enke, 1888

Eibl N, Krugluger W, Steit G, Schratlbauer K, Hopmeier P, Schernthaner G. Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2004; 34:205-209

Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. *Pharmakologie und Toxikologie*. München: Urban & Fischer Verlag, 2005: 9. Auflage

Entman ML, Ballantyne CM. Inflammation in acute coronary syndromes. *Circulation* 1993; 88:800-803

Et-Taouil K, Safar M, Plate GE. Mechanisms and consequences of large artery rigidity. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:205-211

Ezzati M, Vander Hoorn S et al.. Estimates of global and regional potential health gains from reducing multiple major risk factors. *Lancet* 2003; 362:271-280

Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults. *JAMA* 2002; 287:3116-3126

Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988; 93:515-524

Ferketich AK, Schwartzbaum JA, Frid DJ, Moeschberger ML. Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I study. National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2000; 160:1261-1268

Ferreri NR, Zhao Y, Takizawa H, McGiff JC. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -angiotensin interactions and blood pressure. *J Hypertens* 1997; 15:1481-1484

Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986; 315:983-989

Finckenberg P, Inkinen K, Ahonen J et al.. Angiotensin II induces connective tissue growth factor gene expression via calcineurin-dependent pathways. *Am J Pathol* 2003; 163:355-366

Flier JS, Underhill LH. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992; 326:800-808

Francis GS. ACE inhibition in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 201-202

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376

Francus T. IL1, IL6 and PDGF mRNA expression in alveolar cells following stimulation with tobacco-derived antigen. *Cell Immunol* 1992; 145:156-174

Freedman JE, Loscalco J. Platelet-monocyte aggregates. Bridging thrombosis and inflammation. *Circulation* 2002; 105:2130-2132

Friend M, Vucenik I, Miller M. Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ* 2003; 326:82-83

Fyhrquist FY, Forslund T, Tikkanen I, Grönhagen-Riska C. Induction of angiotensin-I-converting enzyme in rat lung with captopril. *Eur J Pharmacol* 1980; 67:473-475

Gavard JA, Lustman PJ, Clouse RE. Prevalence of depression in adults with diabetes. An epidemiological evaluation. *Diabetes Care* 1993; 16:1167-1178

Gawaz M, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin  $\alpha IIb\beta 3$  (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991; 8:1128-1134

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98:1164-1171

Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999; 99:1-11

Gawaz M, Ott I, Reininger AJ, Heinzmann U, Neumann FJ. Agglutination of isolated platelet membranes. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1996; 16:621-627

Gazpoz JM, Coxson PG, Goldman PA et al.. Cost effectiveness of aspirin, clopidogrel, or both for secondary prevention of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1800-1806

Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, Goggins M, Cream P, Kelly A, Kelleher D, Walsh M. Elevated levels of circulating soluble adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *Am J Cardiol* 1997; 80:617-619

Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GY. Abnormalities of haemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. *Circulation* 2001; 103:1746-1751

Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 19:1431-1438

Ginsberg MH, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1995; 74:352-359

Glazier J. Measurement of platelet aggregation in whole blood. *American Clinical Products review* 1987

Gleerup G, Winter K. The effect of ageing on human platelet sensitivity to serotonin. *Eur J Clin Invest* 1988; 18:504-506

Goa KL, Wagstaff AJ. Losartan Potassium: a review of pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of hypertension. *Drugs* 1996; 51:820-845

Gohlke P, Linz W, Scholkens BA et al.. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves cardiac function. Role of bradykinin. *Hypertension* 1994; 23:411-418

Goldberg AI, MC Dunlay, CS Sweet. Safety and tolerability of losartan potassium, an angiotensin II receptor antagonist, compared with hydrochlorothiazide, atenolol, felodipine and angiotensin-converting enzyme inhibitors for the treatment of systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1995; 75(12):793-795.

Gori T, Burstein J M, Ahmed S et al.. Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance. A human in vivo study. *Circulation* 2001; 104:1119-1123

Gotthardt U, Schweiger U, Fahrenberg J, et al.. Cortisol, ACTH and coagulation response to a cognitive challenge paradigm in aging and depression. *Am J Physiol* 1995; 268:865-873

Grabos M, Brertschin S, Bühler FR et al.. Identification of AT1 receptor on human platelets and decreased angiotensin II binding in hypertension. *J Hypertens* 1993; 11:5230-5231

Gradmann AH et al.. A randomized, placebo-controlled, double-blind, parallel study of various doses of losartan potassium compared with enalapril hypertension. *Hypertension* 1995; 25(1):37-46

Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A et al.. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 1997; 81:804-811

Gresele P et al.. Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood. *Thromb.Haemostas* 1983; 50(4):852-856

Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 2000; 91:21-27

Gross F. Renin and hypertension, physiologische und pathophysiologische Wirkstoffe. *Klin Wochenschr* 1958; 36:693-705

Grundey SM, Howard B, Smith S, Eckel R, Redberg R, Bonow RO. Prevention Conference VI: diabetes and cardiovascular disease. Executive summary: conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the american heart association. *Circulation* 2002; 105:2231-2239

Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y et al.. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:247-252

Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide and apoptosis. *Vitam Horm* 1999; 57:49-77

- Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339:229-234
- Halushka PV, Mayfield R, Wohltmann HJ, Rogers RC, Goldberg AK, McCoy SA et al.. Increased platelet arachidonic acid metabolism in diabetes mellitus. *Diabetes* 1981; 30:44-48
- Halushka MK, Halushka PV. Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A<sub>2</sub>? *Circulation* 2002; 105:1620-1622
- Han P, Ardlie NG. The influence of pH, temperature and calcium on platelet aggregation: maintenance of environmental pH and platelet function for in vitro studies in plasma stored at 37°C. *Br J Haematol* 1974; 26:373-389
- Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induced interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappaB transcription factors. *Circ Res* 1999; 84:695-703
- Hardeman MR, Vreeken J, Goedhart PT, Oosting PR. Transient aggregation of human blood platelets in fresh plasma. I. Methodology. *Thromb Res* 1989; 54:719-731
- Harms CS; Tripplett DA. Platelet aggregation. *Laboratory Management* 1977
- Haught WH, Mansour M, Rothlein R et al.. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996; 132:1-8
- Hauner H, Scherbaum WA. Diabetes mellitus Typ 2. *Dtsch Med Wschr* 2002; 127:1003-1005
- Hauner H, Maxion-Gergemann S, Müller E, Schulz M, Huppertz E, Bergemann R. Disease Management Programm Diabetes mellitus: Simulation der Behandlungsergebnisse verschiedener Leitlinien. *Dtsch Med Wschr* 2003; 128:1167-1172
- Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T et al.. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108:2134-2140
- Hayden M, Pignone M, Phillips C, Mulrow C. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2002; 136:161-172
- Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Vitamin E Supplementation and Cardiovascular Events in High-Risk Patients. *N Engl J Med* 2000; 342:154-160
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20.536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:7-22
- Hekimsoy Z, Payzin B, Ornek T, Kandogan G. Mean platelet volume in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2004; 18:173-176
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G et al.. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334:297-314
- Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD 40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-594
- Henrion D, Kubis N, Lévy BI. Physiological and pathophysiological functions of the AT<sub>2</sub> subtype receptor of angiotensin II. From large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 2001; 38:1150-1157

- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M et al.. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88:14-22
- Hippisley-Cox J, Fielding K, Pringle M. Depression as a risk factor for ischaemic heart disease in men: population based case-control study. *BMJ* 1998; 316:1714-1719
- Ho CH, Chan IH. The influence of time of storage, temperature of storage, platelet number in platelet-rich plasma, packed cell, mean platelet volume, hemoglobin concentration, age, and sex on platelet aggregation test. *Ann Hematol* 1995; 71:129-133
- Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 1998; 32:387-392
- Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistanc. *Am J Cardiol* 2003; 92:10-17
- Hughes A, Mc Verry BA, Wilkinson L, Goldstone AH, Lewis D, Bloom A. Diabetes, a hypercoagulable state? Hemostatic variables in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Acta Haematol* 1983; 69:254-259
- Hulley S, Grady D, Bush T et al.. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal woman. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998; 280:605-613
- Hung J, Lam JYT, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; 92:2432-2436
- Ikonomidis I, Lekakis J, Vamvakou G, Andreotti F, Nihoyannopoulos P. Cigarette smoking is associated with increased circulating proinflammatory and procoagulant markers in patients with chronic coronary artery disease: effects of aspirin treatment. *Am Heart J* 2005; 149:832-839
- Ingerman-Wojenski CM. Simultaneous measurement of platelet aggregation and the release reaction in platelet-rich plasma an in whole blood. *Jnl Med Tech* 1984; 9:697-701
- Ingerman-Wojenski CM, Silver MJ. A quick method for screening platelet dysfunction using the whole blood lumi-aggregometer. *Thromb Haemos*. 1984; 51-2:154-156
- Ito T, Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K. Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; 165:51-55
- James IM, Dickenson EJ, Burgoyne W et al.. Treatment of hypertension with captopril: preservation of regional blood flow and reduced platelet aggregation. *J Hum Hypertens* 1988; 2:21-25
- Jiang B, Xu S, Hou X et al.. Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK. *J Biol Chem* 2004; 279:20363-20368
- Jinchuan Y, Zonggui W, Jimming C, Li L, Xiantao K. Upregulation of CD40-CD40 ligand system in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2004; 339:85-90
- Johnson M, Ramey E, Ramwell PW. Sex and age differences in human platelet aggregation. *Nature* 1975; 253:355-357
- Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A et al.. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992; 19:464-474

Jones RJ, Delamothe AP, Curtis LD, Machin SJ, Betteridge DJ. Measurement of platelet aggregation in diabetic using the new electronic platelet aggregometer. *Diabetic medicine* 1985; 2:105-109

Jr. Gotto AM, Farmer JA. Pleiotropic effects of statins: do they matter? *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:391-394

Jr. Smith SC, Blair SN, Bonow RO et al.. AHA/ACC Scientific Statement: AHA/ACC guidelines for prevention heart attack and death in patients with atherosclerotic cardiovascular disease: 2001 update: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 2001; 104:1577-1579

Katon WJ, Von Korff M, Lin EH, Simon G, Ludman E, Russo J, Ciechanowski P, Walker E, Bush T. The Pathways Study: a randomized trial of collaborative care in patients with diabetes and depression. *Arch Gen Psychiatry* 2004; 61:1042-1049

Keating FK, Sobel BE, Schneider DJ. Effects of increased concentrations of glucose on platelet reactivity in healthy subjects and in patients with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2003; 92:1362-1365

Kelm M, Strauer BE. Akuter Myokardinfarkt- primäre Angioplastie oder Thrombolyse? *Internist* 2000; 41:1331-1343

Kiarash A, Pagano PJ, Tayeh M et al.. Upregulated expression of rat heart intercellular adhesion molecule-1 in angiotensin II- but not phenylephrine- induced hypertension. *Hypertension* 2001; 37:58-65

Kintsurashvili E, Duka I, Gavras I et al.. Effects of Ang II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:1778-1783

Kop WJ, Gottdienser JS, Tangen CM et al.. Inflammation and coagulation factors in persons > 65 years of age with symptoms of depression but without evidence of myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 2002; 89:419-424

Kramer C, Sunkomat J, Witte J et al.. Angiotensin II receptor-independent anti-inflammatory and antiaggregatory properties of losartan. *Circ Res* 2002; 90:770-776

Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CA et al.. Angiotensin induced inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1623-1629

Kranzhöfer R, Browatzki M, Schmidt J, Kübler W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:826-828

Kraus RM, Eckel RH, Howard B et al.. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000; 102:2284-2299

Kjeldsen SE et al.. Effects of losartan on cardiovascular morbidity and mortality in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy. A Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) substudy. *JAMA* 2002; 288:1491-1498

Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low density lipoprotein, and triglycerides: A current review. *Am J Cardiol* 2000; 86:5-10

Lages B, Weiss HJ. Dependence of human platelet functional responses on divalent cations. aggregation and secretion in heparin- and hirudin-anticoagulated platelet rich plasma and the effect of chelating agents. *Thromb Haemost* 1981; 45:173-179

Laghriissi-Thode F, Wagner WR, Pollock BG et al.. Elevated platelet factor 4 and  $\beta$ -thromboglobulin plasma levels in depressed patients with ischemic heart disease. *Biol Psychiatry* 1997; 42:290-295

Lamontagne D, Pohl U, Busse R. Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circ Res* 1992; 70:123-130

Larsson PT, Schwieler JH, Wallen NH. Platelet activation during angiotensin II infusion in healthy volunteers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11:61-69

Lauer MS. Clinical practice. Aspirin for primary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2002; 346:1468-1474

Lee CD, Blair SN, Jackson AS. Cardiorespiratory fitness, body composition, and all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:373-380

Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1018-1022

Lefkowitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332:1553-1559

Lehmann K, Groscurth P, Vollenweider I, von Felten A, Rhyner K. Morphologic alterations of blood cells in the impedance aggregometer. *Blood cells* 1985; 11:325-336

Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-2850

Li N, Wallen NH, Hjerdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation* 1999; 100:1374-1379

Li Y, Woo V, Bose R. Platelet hyperactivity and abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:1480-1489

Lindmark E, Siegbahn A. Tissue factor regulation and cytokine expression in monocyte-endothelial cell co-cultures. Effects of a statin, an ACE-inhibitor and a low-molecular-weight heparin. *Thromb Res* 2002; 108:77-84

Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1996; 331:417-424

Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a blood range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998; 339:1349-1357

Lopez-Farre A, Sanchez de Miguel L, Monton M et al.. Angiotensin II AT1 receptor antagonists and platelet activation. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:45-49

Luvara G, Pueyo ME, Philippe M et al.. Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1408-1416

Lyberg T, Stanley ER, Prydz H. Colony stimulating factor-1 induces thromboplastin activity in murine macrophages and human monocytes. *J Cell Physiol* 1987; 132:367-370

Mackie IJ and Machin SJ. Platelet aggregation measurement. *MLW* 1984; 19-22

Maes M, Ombelet W, DeJongh R et al.. The inflammatory response following delivery is amplified in women who previously suffered from major depression, suggesting that major depression is accompanied by a sensitization of the inflammatory response system. *J Affect Disord* 2001; 63:85-92

- Mandal S, Sarode R, Dash S, Dash RJ. Hyperaggregation of platelets detected by whole blood platelet aggregometry in newly diagnosed noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Pathol* 1993; 100:103-107
- Mannucci L, Redaelli R and Tremoli E. Effects of blood cells on platelet aggregation by impedance method. *Thromb Haemostas* 1987; 58-1:1-676
- Markham A., Goa K.L., Valsartan. A review of its pharmacology and therapeutic use in essential hypertension. *Drugs* 1997; 54:299-311
- Marquart-Elbaz C et al.. *Brit J Dermatol* 2002; 147:617-618
- Martin G, Dol F, Mares AM et al.. Lesion progression in apoE-deficient mice: implication of chemokines and effect of the AT1 angiotensin II receptor antagonist Irbesartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43:191-199
- Martin JF, Bath PM, Burr ML. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet* 1991; 338:1409-1411
- Marx N, Sukhova GK, Collins T et al.. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999; 99:3125-3131
- Matetzky S, Tani S, Kangavari S et al.. Smoking increases tissue factor expression in atherosclerotic plaques: implications for plaque thrombogenicity. *Circulation* 2000; 102:602-604
- Meade TW, Brennan PJ. Determination of WHO may derive most benefit from aspirin in primary prevention: subgroup results from a randomised controlled trial. *BMJ* 2000; 321:13-17
- Mendelsohn FAO, Lloyd CJ, Kachel C, Funder JW. Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. *J Clin Invest* 1982; 70:684-692
- Mervaala EM, Muller DN, Park JK et al.. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 1999; 38:389-395
- Mervaala E, Finckenberg P, Lapatto R et al.. Lipic acid supplementation prevents angiotensin II-induced renal injury. *Kidney Int* 2003; 64:501-508
- Mizuno K, Santomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T, Kurita A, Nakamura H, Ambrose JA. Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326:287-291
- Mollnau H, Wendt M, Szocs K et al.. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/ cGMP signaling. *Circ Res* 2002; 90:58-65
- Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30:293-331
- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:361-374
- Morgenstern E. Platelets morphology/ ultrastructure. In: Bruchhausen Fv., Walter U (edits.) *Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology.* Heidelberg: Springer Verlag, 1997: 27-52
- Moncada S, Higgs A. The L-arginin-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 327:2002-2012
- Mori TA, Vandongen R, Douglas AJ, McCulloch RK, Burke V. Differential effect of aspirin on platelet aggregation in IDDM. *Diabetes* 1992; 41:261-266



- Muller DN, Mervaala EM, Schmidt F et al.. Effect of bosentan on NF-kappaB, inflammation, and tissue factor in angiotensin II-induced endorgan damage. *Hypertension* 2000; 36:282-290
- Muller DN, Heissmeyer V, Dechend R et al.. Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II induced organ damage. *Faseb J* 2001; 15:1822-1824
- Müller MR, Salat A, Pulaki S, Stangl P, Ergun E, Schreiner W, Losert U, Wolner E. Influence of hematocrit and platelet count on impedance and reactivity of whole blood for electrical aggregometry. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1995; 34:17-22
- Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey M, Harrison GD. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. *J Clin Invest* 1995; 95:187-194
- Münzel T, Harrison DG. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med* 1997; 75:891-900
- Münzel T, Jr. Keaney JF. Are ACE inhibitors a „magic bullet“ against oxidative stress? *Circulation* 2001; 104:1571-1574
- Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 1998; 55:580-592
- Myers J, Prakash M, Froelicher V et al.. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 2002; 346:793-801
- Nakai K, Itoh C, Kawazoe K, Miura Y, Sotoyangagi H, Hotta K, Itoh T, Kamata J, Hiramori K. Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta. *Coron Artery Dis* 1995; 6:497-502
- Nagata K, Ishibashi T, Sakamoto T et al.. Effects of blockade of the renin-angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in human cultured monocytes. *J Hypertens* 2001; 19:775-783
- Narahara N, Enden T, Wiiger M et al.. Polar expression of tissue factor in human umbilical vein endothelial cell. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1815-1820
- Nasse H. Das Blut in mehrfacher Beziehung physiologisch und pathologisch untersucht. Bonn 1836
- Neri Serneri GG, Gensini GF, Poggesi L et al.. The role of extra platelet thromboxane A<sub>2</sub> in unstable angina investigated with dual thromboxane A<sub>2</sub> inhibitor: importance of activated monocytes. *Coron Artery Dis* 1994; 5:137-145
- Nesto RW. Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: Current concepts. *Am J Med* 2004; 116:11-22
- Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M et al.. Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:534-539
- Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF et al.. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J* 1998; 135:170-178
- Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-Type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002; 105:393-396
- Nierbauer J, Hambrecht R, Velich T et al.. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation* 1997; 96:2534-2541

- Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995; 95:46-54
- Nowak J, Murray JJ, Oates JA, Fitzgerald GA. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation* 1987; 76:6-14
- Nurden A. Human platelet glycoproteins. In: *Haemostasis and Thrombosis*. Ed. Bloom A, Forbes CD. Churchill Livingstone 1994; 3rd edition: 259-285
- Ohara Y, Perterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91:2546-2551
- Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2000; 35:68-75
- Okunishi H, Miyazaki M, Toda N. Evidence for a putatively new angiotensin II- generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 1984; 2:277-284
- Opie LH. ACE inhibitors for hypertension. New York: Wiley-Liss New York, 1992: 23-70
- Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* 1998; 82:619-628
- Page IH, Helmer OM. Angiotensin activator, renin, and angiotonin inhibitor and the mechanism of angiotonin tachyphylaxis in normal, hypertensive and nephrectomized animals. *J Exp Med* 1940; 71:485-519
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526
- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S et al.. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation* 1999; 100:1646-1652
- Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1710-1713
- Patrono C, Davi G, Giabattoni G. Thromboxane biosynthesis and metabolism in relation to cardiovascular risk factors. *Trends Cardiovasc Med* 1992; 2:15-20
- Patrono C, Falco A, Davi G. Isoprostane formation and inhibition in atherothrombosis. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5:198-203
- Paul M, Prinz M, Harms E, Unger TH, Lang RE, Ganten D. Localization of renin and converting enzyme in nerve endings of rat brain. *Brain Res* 1985; 334:315-324
- Peeters AC, Nelea MG, Kullberg BJ, Thien T, Van der Meer JW. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. *Immunology* 1998; 94:376-379
- Pedersen TR, Kjeshus J, Berg K et al.. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389
- Piepho RW. Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am J Health-Syst Pharm* 2000; 57(Suppl 1):3-7
- Philips DR, Charo IF, Scarborough RM. GP IIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; 65:359-362

Pitt B, Waters D, Brown WV et al.. Aggressive lipid-lowering therapy compared with angioplasty in stable coronary artery disease. Atorvastatin versus Revascularization Treatment Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341:70-76

Piqueras L, Kubes P, Alvarez A et al.. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT1(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 2000; 102:2118-2123

Plante GE. Depression and cardiovascular disease: a reciprocal relationship. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005; 54:45-48

Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GP IIB-IIIa: a status report. *Sem Thromb Hemost* 1992; 18:324-332

Pohl U, Nolte C, Buse A, Eigenthaler M, Walter U. Endothelium-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated protein in platelets during coronary passage. *Am J Physiol* 1994; 266:606-612

Pratt RE, Zou WM, Naftilian AJ, Ingelfinger JR, Dzau VJ. Altered sodium regulation of renal angiotensinogen mRNA in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 256:469-474

PROGRESS Collaborative Group. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6.105 individuals with previous or stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001; 358:1033-1041

Proudfoot JM, Croft KD, Puddey IB, Beilin LJ. Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit basal as well as low-density lipoprotein and platelet-activating factor stimulated human monocyte chemoattractant protein-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305:846-853

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A et al: Angiotensin II stimulates endothelial vascular adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:645-651

Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:979-984

Queen LR, Ji Y, Goubareva I, Ferro A. Nitric oxide generation mediated by beta-adrenoceptors is impaired in platelets from patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2003; 46:1474-1482

Quehenberger P, Bierhaus A, Faching P. Endothelin-1 transcription is controlled by nuclear factor- kappa B in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 2000; 49:1561-1570

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2:1057-1058

Rajavashisth TB, Andalibi A, Terito MC et al.. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 1990; 344:254-257

Reilly IAG, Fitzgerald GA. Eicosanoid biosynthesis and platelet function with advancing age. *Thromb Res* 1986; 41:545-554

Riess H et al.. Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:50-56

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336:973-979

Ridker PM, Rifai N, Clearfield M et al.. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med* 2001; 344:1959-1965

- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101:1767-1772
- Rix E, Ganten D, Schüll B, Unger Th, Taugner R. Converting enzyme in the choroid plexus, brain and kidney: immunocytochemistry and biochemical studies in rats. *Neurosci Lett* 1981; 22:125-130
- Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P et al.. Selektive aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology* 2002; 143:4828-4836
- Rogerson FM, Chai SY, Schlawe I, Murray WK, Marley PD, Mendelsohn FAO. Presence of angiotensin converting enzyme in the adventitia of large blood vessels. *J Hypertens* 1992; 10:615-620
- Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol* 1999; 84:1018-1022
- Rose RM, Kozbik L, Filderman AE et al.. Characterisation of colony stimulating factor activity in the human respiratory tract. Comparison of healthy smokers and non smokers. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:394-399
- Rosenberger G, Fichtlscherer S. Analysis of forearm circulation – a substitute for diagnosis of coronary atherosclerosis. *Herz* 1998; 23:130-134
- Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins. *JAMA* 1998; 279:1643-1650
- Rosove MH, Frank HJ, Harwig SS. Plasma  $\beta$ -thromboglobulin, platelet factor 4, fibrinopeptide a, and other hemostatic functions during improved, short-term glycemic control in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1984; 7:174-179
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809
- Roth P, Stanley ER. The biology of CSF-1 and its receptor. *Current topics in microbiology and immunology*. Berlin: Sonneg-Verlag, 1992:141-158
- Ruggeri ZM. New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol*. 1994; 31:229-239
- Rugulies R. Depression as a predictor for coronary heart disease. A review and meta-analysis. *Am J Prev Med* 2002; 23:51-61
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int* 2000; 57:2285-2298
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M et al.. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol* 2001; 158:1743-1756
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O et al.. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 2002; 12-22
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular Mechanisms of Angiotensin II-induced vascular Injury. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5:73-79
- Sacco M, Pellegrini F, Rocaglioni MC et al.. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients. results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes Care* 2003; 26:3264-3272

Sagel J, Colwell JA, Crook L, Laimins M. Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1975; 82:733-738

Sano M, Fukuda K, Kodama H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, Takahashi T, Makino S, Kato T, Ogawa S. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:29717-29723

Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatkeyama K, Smuiyoshi A. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 1996; 75:389-392

Schächinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation* 1995; 92:2087-2094

Schäfer A, Fraccarollo D, Hildemann S et al.. Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by selektive aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition: role of endothelial function and platelet VASP phosphorylation. *Thromb Haemost* 2003; 89:1024-1030

Schanstra JP, Marin-Castano ME, Praddaude F et al.. Bradykinin B(1) receptor-mediated changes in renal hemodynamics during endotoxin-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:1208-1215

Schartl M, Bocksch W, Koschyk DH et al.. Use of intravascular ultrasound to compare effects of different strategies of lipid-lowering therapy on plaque volume and composition in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104:387-392

Schatz H. UKPDS und DECODE: Zwei neue Studien liefern neue Erkenntnisse für die Diagnostik und Therapie der Zukunft. *Innovartis* 2001; 1:8-10

Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ et al.. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1-cells. *J Biol Chem* 1997; 272:28568-28573

Scherbaum WA, Hauner H. Versorgung von Menschen mit Diabetes in Deutschland – wo stehen wir heute? *Dtsch Med Wschr* 2003; 128:1159-1160

Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D et al.. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000; 101:1372-1378

Schmidt AM, Hasu M, Popov D. Receptor for advanced glycation end products has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE-proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8807-8811

Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept* 2000; 93:65-77

Schwemmer M, Sommer O, Bassenge E. Angiotensin receptor blocker losartan suppresses platelet activity by interfering with thromboxane signaling. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2001; 15:301-307

Seeland U, Kouchi I, Zolk O, Itter G, Linz W, Böhm M. Effect of ramipril and furosemide treatment on interstitial remodeling in post-infarction heart failure rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:151-163

Serebruany VL, Glassman AH, Malinin AI et al.. Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial Study Group. Platelet/endothelial biomarkers in depressed patients treated with the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline after acute coronary events: the Sertraline Antidepressant Heart Attack Randomized Trial (SADHART) platelet substudy. *Circulation* 2003; 108:939-944

Serruys PW, de Feyter P, Macaya C et al.. Lescol Intervention Prevention Study (LIPS) Investigators. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 287:3215-3222

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P et al.. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91:406-413

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I et al.. For the West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Prevention of coronary artery disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *New Engl J Med* 1995; 333:1301-1307

Shet T, Parker T, Block A, Hall C, Adam A, Pfeffer MA, Stewart DJ, Qian C, Rouleau JL. IMPRESS Investigators. Comparison of the effects of omapatrilat and lisinopril on circulating neurohormones and cytokines in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2002; 90:496-500

Shimbo D, Child J, Davidson K et al.. Exaggerated serotonin-mediated platelet reactivity as a possible link in depression and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2002; 89:331-333

Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69:50-178

Siess W. Platelet receptors: the thrombin receptor. In: Bruchhausen Fv., Walter U (eds.) *Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology*. Heidelberg, Springer Verlag, 1997: 101-116

Sixma JJ, van ZG, Banga JD, Nieuwenhuls HK, de GP. Platelet adhesion. *Semin Haematol* 1995; 32:89-98

Sixt S, Schuler G, Niebauer J. Diabetes mellitus Typ 2 und koronare Herzkrankheit. *Dtsch Med Wschr* 2004; 129:1385-1389

Skidgel Ra, Schulz WW, Tam LT, Erdös EG. Human renal angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase. *Kidney Int* 1987; 31(Suppl 20):45-48

Skowasch D, Lentini S, Andrié R, Jabs A, Bauriedel G. Verminderte Plättchenaggregation bei ACE-Hemmertherapie. *Dtsch Med Wschr* 2001; 126:707-711

Small M, Douglas JT, Lowe GD, MacCuish AC, Forbes CD. Effect of insulin therapy on coagulation and platelet function in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Haemostasis* 1986; 16:417-423

Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8264-8268

Someya N, Morotomi Y, Kodama K et al.. Suppressive effects of captopril on platelet aggregation in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6:840-843

Staels B, Koenig W, Habib A et al.. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998; 393:790-793

Stein B, Fuster V, Israel DE et al.. Platelet inhibitor agents in cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14:813-836

Strukova SM. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66:8-18

Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelial biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:429-437

- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O et al.. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003; 35:881-900
- Takeuchi M, Yanase Y, Matsuura N. Immunological detection of a novel advanced glycation end product. *Mol Med* 2001; 7:783-791
- Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX et al.. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics*, 2002; 11:21-30
- Tham DM, Wang YX, Rutledge JC. Modulation of vascular inflammation by PPARs. *Drug News Perspect* 2003; 16:109-116
- The British Society for Haematology. BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. Laboratory techniques. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* 1988; 41:1330-1322
- The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 2000; 342:145-153
- Tigerstedt R, Bergmann PG. Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol* 1898; 8:223-271
- Timmermanns PB, Wrong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Ang II receptors and Ang II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45:205-251
- Tomaselli L, Cerletti C, de Gaetano G, Notarbartolo A, Davi G, Pupillo M. Normal platelet function, but increased platelet activation in vivo in diabetic patients. *Thromb Haemost* 1990; 64:604
- Toto R. Angiotensin II subtype 1 receptor blockers and renal function. *Arch Intern Med* 2001; 161:1492-1499
- Tschoepe D, Roesen P, Kaufmann L, Schauseil S, Kehrel B, Ostermann H et al.. Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1990; 20:166-170
- Tschoepe D. The activated megakaryocyte-platelet-system in vascular disease: Focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21:152-160
- Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, Ohnishi M, Sawaki M, Fujii M, Matsumoto T, Kinoshita M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:714-721
- Tsutsumi K, Saeedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1-AT2) in rat brain. *Am J Physiol* 1991; 261:209-216
- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL et al.. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999; 100:1223-1229
- Urata H, Konoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990; 265:22348-22357
- Usui M, Egashira K, Tomita OH et al.. Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 2000; 101:305-310
- Usui M, Egashira K. Angiotensin II receptor and oxidative stress. *Nippon Rinsho* 2002; 60:1893-1897

- Vane J, Anggard E, Botting R. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Sek PM et al.. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9220-9225
- Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24:1476-1485
- Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt a. M.: Meidinger, 1865
- Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis-evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999; 99:2027-2033
- Wassertheil-Smoller S, Applegate WB, Berge K et al.. Change in depression as a precursor of cardiovascular events. SHEP Cooperative Research Group (Systolic Hypertension in the elderly). *Arch Intern Med* 1996; 156:533-561
- Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, Kropiwnicka A, Drzewoski J. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin): its relation to metabolic control. *Thromb Res* 2004; 113:101-113
- Watts SE, Turnbridge LJ, Smith K, Lloyd JV. Storage of platelets for tests of platelets function: effects of temperature on platelet aggregation, platelet morphology and liberation of  $\beta$ -thromboglobulin. *Thromb Res* 1986; 44:365-376
- Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999; 335:900
- Wienen W, Haeucl N, Van MJCA et al.. Pharmacological characterization of the novel nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 1993; 110:245-252
- Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja M. Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 1989; 80:198-205
- Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Libby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:684-691
- Winocour PD, Watala C, Kinglugh-Rathbone RL. Membrane fluidity is related to the extent of glycation of proteins, but not to alterations in the cholesterol to phospholipid molar ratio in isolated platelet membranes from diabetic and control subjects. *Thromb Haemost* 1992; 67:567-571
- Wirth A. Lebensstiländerung zur Prävention und Therapie von arteriosklerotischen Krankheiten. *Dtsch Arztebl* 2004; 101:1745-1752
- Wolf G, Wenzel UO. Angiotensin II and Cell Cycle Regulation. *Hypertension* 2004; 43:693-698
- Wong J, Rauhoff C, Dilley RF et al.. Angiotensin-converting enzyme inhibitor abolishes medial smooth muscle PDGF-AB biosynthesis and attenuates cell proliferation in injured carotid arteries: relationships to neointima formation. *Circulation* 1997; 96:1631-1640
- Wong SC, Fukuchi M, Melnyk P et al.. Induction of Cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 98:100-103



Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Pyörälä K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. *Eur Heart J* 1998; 19:1434-1503

Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 261:1553-1558

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288:321-333

Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J Clin Pathol* 1988; 39:701-712

Yngen M, Ostenson CG, Hu H, Li N, Hjemdahl P, Wallen NH. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 ligand in patients with type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: Evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 2004; 47:537-540

Zimmermann N, Wenk A, Kim U et al.. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108:542-547

Zorrilla EP, Luborsky L, McKay JR, Rosenthal R, Houldin A, Tax A, McCorkle R, Seligman DA, Schmidt K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun* 2001; 15:199-202

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich insbesondere bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Gerhard Bauriedel für die freundliche Überlassung des Themas und für die vorbildliche Betreuung während meiner Doktorandenzeit bedanken. Ich bin ihm zu tiefst verbunden für die vielen Stunden, die er mir für Beantwortung und Diskussion meiner unzähligen Fragen oft noch bis spät in den Abend opferte. Mein nächster Dank gilt Dr. Dirk Skowasch für die ebenso große Hilfsbereitschaft und Unterstützung auch in schwierigen Phasen, sowie für die Einführung und Unterstützung bei sämtlichen Methoden und Fragen. Dankbar bin ich beiden im Besonderen auch für das außerordentlich freundschaftliche Verhältnis und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Auch die anregenden Diskussionen mit Themen abseits von Forschung und Medizin werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. h.c. B. Lüderitz (em.) und Prof. Dr. G. Nickenig für die freundliche Aufnahme in die Medizinische Klinik und Poliklinik II und für die Möglichkeit zur Teilnahme am akademischen Leben der Klinik. Als Unterstützung im Labor und bei der Erlernung neuer Techniken stand mir eine Vielzahl weiterer Personen tatkräftig zur Seite. Bedanken möchte ich mich hier ausdrücklich bei den Mit-Doktoranden Melanie Schneider, Martin Steinmetz, Arne Gockel, Christian Stüsser, Izabella Tuleta, David Reek und Anne Floeck, die außerdem für eine sehr nette Atmosphäre im Labor sorgten.

Außerhalb des Labors gilt natürlich mein größter Dank meinen Eltern und meinem Bruder, durch deren Unterstützung, Motivationsgabe und Rückhalt diese Arbeit erst fertig gestellt werden konnte. An dieser Stelle bedanke ich mich auch von ganzem Herzen bei meinen Eltern für die Ermöglichung meines Medizinstudiums. Ein außerordentlicher Dank gebührt auch Miriam, die mich während der Bearbeitung der Doktorarbeit immer unterstützt hat.



## Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

**Skowasch D, Viktor A, Schneider-Schmitt M, Lüderitz B, Nickenig G, Bauriedel G.** Differential antiplatelet effects of angiotensin converting enzyme inhibitors: Comparison of ex vivo platelet aggregation in cardiovascular patients with ramipril, captopril and enalapril. *Clin Res Cardiol* 2006; 95:212-216

### Kongressbeiträge

**Viktor A, Skowasch D, Schneider M, Lüderitz B, Bauriedel G.** Antithrombozytäre Effekte bei selektiver AT1-Blocker- und ACE-Hemmer-Therapie: Modifizierte ex vivo Plättchenaggregation bei kardiovaskulär erkrankten Patienten. *Z Kardiologie* 2004; 93:Suppl.5:00202

**Viktor A, Skowasch D, Floeck A, Bauriedel G.** Antiplatelet effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angiotensin II subtype 1 receptor blockers (ARBs): Modified ex vivo platelet aggregation of 374 cardiovascular patients. *J Am Coll Cardiol* 2006; 46:365 A

**Viktor A, Tuleta I, Steinmetz M, Nickenig G, Bauriedel G, Skowasch D.** Assoziation von Diabetes mellitus mit erhöhter ex vivo-Plättchenaggregation und vermindertem Ansprechen auf ASS: Modulation durch Blockade des Renin-Angiotensin-System (RAS). *Clin Res Cardiol* 2007; 96:Suppl.1:P590